



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DE RECETORES DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS DE PACIENTES CANINOS  
COM LINFOMA B

MIRIAM MONTEIRO FREIRE

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia  
Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil  
Doutor José Alexandre da Costa  
Perdigão e Cameira Leitão

ORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque  
Coelho Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Frederico Aires da Silva  
Dra. Sílvia Pires Pinheiro

2017

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ANÁLISE DE RECETORES DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS DE PACIENTES CANINOS  
COM LINFOMA B

MIRIAM MONTEIRO FREIRE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

Doutor José Alexandre da Costa

Perdigão e Cameira Leitão

ORIENTADOR

Doutora Solange Judite Roque

Coelho Alves Gil

CO-ORIENTADOR

Doutor Frederico Aires da Silva

Dra. Sílvia Pires Pinheiro

2017

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

À minha família, por todo o apoio e encorajamento que me deram nos momentos mais difíceis do curso, por não me deixarem desistir e por serem um exemplo de perseverança.

À minha orientadora nesta tese, a Professora Solange Gil, pela sua paciência para comigo, pela sua ajuda valiosa e pela sua compreensão e disponibilidade. E por me ter orientado para o projeto do Linfoma canino, o qual estou muito grata por ter feito parte.

Ao meu co-orientador nesta tese, o Doutor Frederico Silva, pela sua ajuda preciosa em todos os momentos da realização deste projeto, pela sua motivação quando as experiências não corriam tão bem, e pela oportunidade de ter feito parte da sua equipa no laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UL.

Ao CIISA e à Fundação para a Ciência e Tecnologia que através do projeto CIISA 15 da Professora Solange Gil: “Clinical and immunological characterization of naturally occurring canine lymphoma” e do projeto do Doutor Frederico Aires da Silva, IF/01010/201, financiaram este trabalho.

Ao Professor Luís Tavares, por ter providenciado os recursos necessários para o projeto do Linfoma canino, no qual estive inserido o trabalho desta dissertação de mestrado.

À Dra. Joana Dias, por me ter acompanhado e me ter ensinado tanto ao longo dos dois meses que estive a estagiar no laboratório da FMV-UL. Estou eternamente grata pela sua ajuda incessante e por ter tido o privilégio de trabalhar ao seu lado.

A toda a equipa do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-UL com a qual tive oportunidade de trabalhar e aprender imenso. Obrigada pelo vosso exemplo, cuidado e amabilidade em todo o tempo, não vou esquecer sem dúvida toda a vossa ajuda inestimável.

À minha madrinha Clara Freitas, por todo o seu apoio incessável, por estar sempre presente e pelo seu amor incondicional. Obrigada pelo teu exemplo de força e de fé, não podia ter pedido melhor Madrinha.

Aos meus amigos, obrigada por estarem sempre presentes mesmo quando a distância nos separa. Obrigada por me encorajarem e me animarem nos momentos difíceis. Obrigada pelos risos e desabafos e por todos os momentos que passámos juntos. Sem vocês não seria igual.

E por fim, a Deus, por cuidar de mim, por me dar força e ânimo, e por nunca me abandonar. Por tudo estou eternamente grata.

## Resumo

### ANÁLISE DE RECETORES DE SUPERFÍCIE EM LINFÓCITOS DE PACIENTES CANINOS COM LINFOMA B

O linfoma canino constitui uma das neoplasias malignas mais frequentemente diagnosticada em cães, tendo normalmente origem em células B.

Atualmente utiliza-se a quimioterapia como forma de tratamento desta patologia, mas a resistência aos fármacos anti-neoplásicos e a toxicidade destes, revela a necessidade de desenvolvimento de outras formas de tratamento, como a imunoterapia.

Com o objetivo de validar alvos potenciais para imunoterapia do linfoma B canino, foi avaliada, através de Western Blot, a expressão proteica dos recetores CD20 e de CD19 de células primárias de linfoma canino. Para tal, foram utilizadas amostras de linfonodos de 20 animais com linfoma recolhidas no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, e de 2 animais de controlo, sem linfoma.

Durante a preparação das amostras, as células foram lisadas com o reagente RIPA para extração da proteína total, que foi posteriormente quantificada através do método de *Bradford*.

Os resultados obtidos demonstraram uma elevada expressão de CD20 em células primárias de linfoma B canino do biobanco e em CLBL-1 (linha estável de linfoma canino). Por outro lado, a avaliação da expressão do recetor CD19 não foi conclusiva. Foi também utilizada com sucesso a avaliação de potenciais alvos para imunoterapia através da técnica de Western Blot e deteção com um soro policlonal derivado de coelhos imunizados com células primárias de linfoma B canino.

Estes resultados confirmam que tal como no Homem, no cão o CD20 é expresso particularmente em situações de linfoma B, validando este marcador como alvo potencial para imunoterapia. Ademais, foi igualmente possível demonstrar a identificação de outras proteínas no extrato proteico das células dos casos clínicos com o soro policlonal do coelho, podendo estas corresponder a recetores potenciais que poderiam ser usados como alvos terapêuticos ou como biomarcador / diagnóstico.

Palavras- Chave: CD20, CD19, Linfoma B canino, Imunoterapia



## **Abstract**

### **ANALYSIS OF SURFACE RECEPTORS IN LYMPHOCYTES OF CANINE PATIENTS WITH B CELL LYMPHOMA**

Canine lymphoma is one of the most frequently diagnosed malignancies in dogs, usually originating from B cells.

Chemotherapy is currently used as a treatment for this pathology, but the resistance to anti-neoplastic agents and the toxicity produced by these drugs, reveals the need to develop other forms of treatment, such as immunotherapy.

In order to validate potential targets for canine B cell lymphoma immunotherapy, the proteic expression of CD20 and CD19 receptors of primary canine lymphoma cells was evaluated through Western Blot. For this purpose, lymph node samples from 20 animals with lymphoma collected at FMV-ULisboa School Hospital and 2 from control animals, without lymphoma, were used.

During sample preparation, the cells were lysed with the RIPA reagent to extract the total protein, which was further quantified by the *Bradford* method.

The results obtained demonstrated a high expression of CD20 in primary canine B-cell lymphoma cells from the biobank and in CLBL-1 (stable line of canine lymphoma). On the other hand, the evaluation of CD19 receptor expression was not conclusive. The evaluation of potential targets for immunotherapy using the Western blot technique and detection with a polyclonal serum derived from rabbits immunized with primary canine B lymphoma cells was also successfully used.

These results confirm that as in humans, in the dog the CD20 is expressed particularly in situations of B cell lymphoma, validating this marker as a potential target for immunotherapy. In addition, it was also possible to demonstrate the identification of other proteins in the protein extract of the cells of the clinical cases with the rabbit polyclonal serum, which could correspond to potential receptors that could be used as therapeutic targets or as a biomarker / diagnosis.

**Keywords:** CD20, CD19, Canine B lymphoma, Immunotherapy





## Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Lista de figuras .....	ix
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Capítulo I - Descrição das atividades de estágio.....	1
Capítulo II – Introdução.....	4
Capítulo III - Revisão bibliográfica sobre o linfoma B canino.....	6
1. Epidemiologia.....	6
2. Etiologia .....	7
3. Classificação.....	8
3.1. Classificação anatômica.....	8
3.2. Apresentação clínica .....	9
3.3. Classificação citológica, histológica e imunofenotípica .....	10
4. Diagnóstico .....	12
4.1. Exame físico .....	12
4.2. Alterações laboratoriais.....	12
4.3. Análise citológica e histopatológica dos linfonodos .....	13
4.4. Técnicas de diagnóstico molecular.....	14
5. Estadiamento .....	14
5.1. Imagiologia.....	15
5.2. Avaliação da medula óssea.....	15
5.3. Análise citológica .....	15
6. Tratamento.....	16
6.1. Quimioterapia.....	16
6.2. Radioterapia.....	18
7. Prognóstico .....	19
8. Imunoterapia .....	20
8.1. CD20.....	22
8.1.1. Anticorpos monoclonais anti-CD20.....	23
8.2. CD19.....	25
8.2.1. Anticorpos monoclonais anti-CD19.....	26
9. Objetivos .....	27
Capítulo IV - Material e Métodos.....	27
1. Caracterização das amostras.....	27
1.1. Avaliação clínica dos animais presentes no estudo.....	28
1.2. Critérios de inclusão.....	28
1.3. Critérios de exclusão.....	28
2. Preparação das amostras .....	28
3. Extração da proteína total .....	29
4. Determinação da concentração de proteína total .....	29
5. Análise das amostras por electroforese.....	29
6. Coloração dos géis .....	29
7. Western Blot .....	30
Capítulo V - Resultados e Discussão.....	32
1. Otimização da técnica .....	32
1.1. Teste do CD20 .....	32
1.2. Teste do CD19 .....	33
2. Casos clínicos .....	34
2.1. Quantificação da proteína total.....	35
3. Avaliação da expressão do CD20 .....	37

4. Avaliação da expressão do CD19 .....	39
5. Soro policlonal do coelho .....	41
5.1. Teste do soro policlonal do coelho .....	41
5.2. Extração das CLBL-1 com o reagente <i>Mem-PER™ Plus Membrane</i> .....	42
5.3. Deteção com o soro policlonal do coelho de potenciais alvos para imunoterapia ....	43
Capítulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras.....	46
Bibliografia .....	48

## Lista de figuras

Figura 1: Cão com linfadenopatia submandibular evidente, resultante de linfoma multicêntrico (Vail <i>et al.</i> , 2013).....	10
Figura 2: Histopatologia de linfoma difuso de células grandes do biobanco (HE, 40X) (Tese de Doutoramento de Joana Dias). ....	13
Figura 3: Estrutura molecular do CD20. Adaptado de Cragg, Walshe, Ivanov e Glennie (2005). ....	23
Figura 4: Estrutura molecular do CD19. Adaptado de Wang <i>et al.</i> (2012). ....	26
Figura 5: Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, Raji e 293, de forma a identificar a presença do recetor CD20. ....	32
Figura 6: Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, Raji e 293, de forma a identificar a presença do recetor CD19. ....	33
Figura 7: Curva de <i>Bradford</i> utilizada na quantificação da proteína total. ....	36
Figura 8: Western Blot do extrato proteico total das células primárias de linfoma canino do biobanco, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, de forma a identificar a presença do recetor CD20. ....	38
Figura 9: Western Blot do extrato proteico total das células primárias de linfoma canino do biobanco, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, de forma a identificar a presença do recetor CD19. ....	40
Figura 10: Gel do extrato proteico total das células CLBL-1 em concentrações decrescentes de 20, 10, 5 e 2,5 µg corado com o <i>Coomassie</i> , à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, à direita. ....	42
Figura 11: Gel do extrato proteico da 1 <sup>o</sup> fração, 2 <sup>o</sup> fração e total (RIPA) das células CLBL-1, corado com o <i>Coomassie</i> , à esquerda. Western Blot do extrato proteico da 1 <sup>o</sup> fração, 2 <sup>o</sup> fração e total (RIPA) das células CLBL-1, à direita. ....	43
Figura 12: Gel do extrato proteico total de algumas das células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, corado com o <i>Coomassie</i> , à esquerda. Western Blot do extrato proteico total de algumas das células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, com o soro policlonal do coelho, à direita. ....	44
Figura 13: Gel do extrato proteico total das restantes células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, corado com o <i>Coomassie</i> à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das restantes células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, com o soro policlonal do coelho, à direita. ....	45
Figura 14: Gel do extrato proteico total das células de linfoma T, linfoma não B nem T, linfoma B, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, corado com o <i>Coomassie</i> , à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das células de linfoma T, linfoma não B nem T, linfoma B, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, com o soro policlonal do coelho, à direita. ....	45

## Lista de tabelas

Tabela 1: Descrição dos casos clínicos de linfoma B canino recolhidos no “Queen’s Veterinary School Hospital” em Cambridge.....	3
Tabela 2: Classificação Anatômica (Owen, 1980).....	9
Tabela 3: Estádios segundo a Organização Mundial de Saúde (Owen, 1980).....	9
Tabela 4: Sistema de classificação de Kiel. Adaptado de Ettinger (2003).....	11
Tabela 5: Classificação das neoplasias das células B segundo a Organização Mundial de Saúde. Adaptado de Vail <i>et al.</i> (2013).....	11
Tabela 6: Tipos de resposta ao tratamento de determinada doença. Adaptado de Ettinger (2003).....	16
Tabela 7: Protocolo de quimioterapia curto da Universidade de Wisconsin Madison (Vail <i>et al.</i> , 2013).....	17
Tabela 8: Tipos de anticorpos e diluições correspondentes utilizadas.....	30
Tabela 9: Anticorpos e diluições correspondentes utilizadas para calibrar os resultados do Western Blot.....	31
Tabela 10: Dados clínicos dos 20 casos de linfoma.....	34
Tabela 11: Dados resultantes da análise imunohistoquímica e o estágio da doença dos 20 animais com linfoma.....	35
Tabela 12: Quantificação da proteína total das CLBL-1, Raji, 293 e das células dos casos clínicos.....	36

## **Lista de abreviaturas**

>: Maior ou igual

<: Menor ou igual

%: por cento

μL: microlitro

ADN: ácido desoxirribonucleico

AgNOR: regiões organizadoras nucleolares argirofílicas

CHOP: Ciclofosfamida, Doxorrubicina (H – hidroxidaunarubicina), Vincristina (O – Oncovin) e Prednisolona

CLBL-1: linha celular de linfoma B canino

COP: Ciclofosfamida, vincristina (O – Oncovin) e Prednisolona

EV: endovenoso

FBS: soro fetal bovino

Fc: região constante

FMV-ULisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

HE: Hematoxilina e eosina

IgG: Imunoglobulina G

MDSCs: células supressoras derivadas de mieloides

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

mM: milimole

MOPP: Mecloretamina, vincristina (O – Oncovin), Procarbazina e Prednisolona

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

NCI: National Cancer Institute

NP-40: nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40

°C: graus centígrados

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAAF: punção aspirativa por agulha fina

PARR: PCR para rearranjos do recetor de antigénios

PBMCs: células mononucleares do sangue periférico

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação de polimerase em cadeia

PET-CT: tomografias axiais computadorizadas com emissão de positrões

PO: *per os*

q24h: a cada 24 horas

qRT-PCR: reação de polimerase em cadeia quantitativa em tempo real

RIPA: radio-immunoprecipitation assay

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

scFv: Fragmento variável de cadeia simples

sdAbs: anticorpos de domínio único

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TK1: timidina quinase

## **Capítulo I - Descrição das atividades de estágio**

O estágio curricular requerido para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária foi dividido em duas componentes distintas, embora se possa definir em 3 momentos.

Iniciei o estágio de fim de curso no Laboratório de Virologia/Imunologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no período entre 5 de Setembro de 2016 a 4 de novembro de 2016, no qual estive inserida num projeto de investigação, em colaboração com o doutoramento da Dra. Joana Dias (FMV-UL), no âmbito da Imunoterapia do Linfoma B canino. Foram cerca de 40 dias, perfazendo em conjunto na ordem de 328 horas. Ao longo desses dois meses em que estive a estagiar no laboratório tive a oportunidade de aprender várias técnicas laboratoriais, entre elas, o Western Blot, o SDS-PAGE, a extração e a determinação da concentração de proteínas, e a coloração de géis. Desenvolvi também a minha capacidade de comunicação através das várias apresentações que concretizei nas reuniões de laboratório, e apurei o espírito crítico durante a resolução de problemas que surgiram no decorrer das experiências efetuadas.

De seguida, numa segunda parte, na área clínica, estagiei três meses, em média 8 horas por dia ou mais aos fins de semana, no Hospital VetOeiras - Hospital Veterinário Central da Linha de Cascais, onde tive a oportunidade de participar em consultas, cirurgias, auxiliar no Internamento e na realização de exames imagiológicos.

No total assisti a cerca de 370 casos, na sua maioria de cães e gatos, à exceção de alguns animais exóticos, particularmente os coelhos.

A área em que desempenhei mais funções foi a de internamento, na qual ajudava a administrar medicações e fluidoterapia, a realizar o exame físico dos animais, a recolher amostras para exames complementares de diagnóstico, e a executar hemogramas, bioquímicas, urianálises, ionogramas, citologias, entre outras análises. Para além disso ainda auxiliei na medição de insulina e corpos cetónicos, na medição da pressão arterial, na mudança de pensos e limpeza de feridas, bem como, na contenção, alimentação e bem-estar dos animais internados, nomeadamente na limpeza das boxes.

Adicionalmente presenciei diversos exames de raio-x, ecografias abdominais, ecocardiografias, radiografias dentárias e endoscopias, entre outros exames imagiológicos.

Em relação às consultas em que participei e em que ajudei no exame físico do animal, na preparação da medicação, na contenção, na aplicação de microchips e vacinas, a maior parte foram de medicina preventiva, seguidas de oftalmologia, de medicina interna, oncologia e ortopedia. Tive igualmente a oportunidade de colaborar em algumas sessões de fisioterapia, onde era realizada eletroestimulação, terapia com ultrassons e laser, e hidroterapia numa passadeira aquática.



Na área de cirurgia, auxiliei na preparação de vários animais, efetuando a tosquia, a assepsia do local da intervenção cirúrgica, assim como, a pré-medicação. Tendo observado e participado como ajudante do cirurgião em cirurgias de oftalmologia, de ortopedia, de odontologia, e em esterilizações e castrações. Além de ter assistido também a uma formação de anestesia de forma a obter mais conhecimentos nesta área.

De modo a presenciar e a recolher casos de linfoma B canino, assim como compreender qual a realidade da medicina veterinária no Reino Unido, surgiu a oportunidade de realizar um estágio de pouco mais de duas semanas no mês de Março de 2017 no Departamento de Oncologia do “Queen’s Veterinary School Hospital” em Cambridge. Embora me concedessem a possibilidade de estagiar por um período de 8 a 10 semanas em todos os departamentos do hospital, só pude concretizar, por razões de índole pessoal, o estágio nos serviços de Oncologia. Ao longo das duas semanas de estágio assisti a consultas, a sessões de radioterapia e quimioterapia, a ressonâncias magnéticas e a tomografias axiais computadorizadas entre outros exames complementares de diagnóstico. No total, acompanhei 46 casos de cães e gatos, que consistiam em carcinomas, adenocarcinomas, melanomas, sarcomas, linfomas, mastocitomas, tumores cerebrais, pulmonares e vesicais, leucemias, osteossarcomas e hemangiossarcomas.

Na tabela 1 estão descritos os 4 casos clínicos de linfoma B canino observados ao longo do estágio em Cambridge. Infelizmente não pude recolher informação muito detalhada destes casos porque o pouco tempo que permaneci em Cambridge conduziu à assistência de uma maior diversidade de casos de Oncologia, ainda que com prejuízo para o acompanhamento detalhado dos casos clínicos referidos. Foi o balanceamento possível, de modo a aproveitar da melhor forma este mini-estágio neste departamento.

Tabela 1: Descrição dos casos clínicos de linfoma B canino recolhidos no “Queen’s Veterinary School Hospital” em Cambridge.

<b>Nome</b>	<b>Ted</b>	<b>Monty</b>	<b>Belle Smith</b>	<b>Frank Rees</b>
<b>Idade</b>		2 Anos e 8 meses	12 Anos e 6 meses	2 Anos e 9 meses
<b>Sexo</b>	Macho	Macho castrado	Fêmea esterilizada	Macho castrado
<b>Raça</b>		Arraçado	Jack Russell Terrier	Welsh Springer Spaniel
<b>Diagnóstico</b>	Linfoma B de grau intermédio, que recidivou	Linfoma B multicêntrico de alto grau	Linfoma B multicêntrico, em remissão parcial	Linfoma multicêntrico de estágio Vb, em remissão completa
<b>Sinais clínicos</b>	Linfonodos aumentados	Pequena elevação dos níveis de cálcio e linfonodos abdominais ligeiramente aumentados	Náuseas após administração da ciclofosfamida, linfonodos submandibulares palpáveis mas sem alteração de tamanho	Problemas cardíacos e gastrointestinais
<b>Análises</b>		Hemograma, PAAF dos linfonodos pré-escapulares	Hemograma, leucograma, bioquímicas e análises de urina	Hemograma, leucograma e bioquímicas
<b>Tratamento</b>	Clorambucil, prednisolona e vincristina	Protocolo CHOP	Protocolo COP, maropitant e furosemida	Protocolo COP, furosemida, omeprazol e paracetamol

## Capítulo II – Introdução

### Enquadramento geral e motivação

Os cães (*Canis lupus familiaris*) são decerto um dos animais de estimação mais populares em todo o mundo e talvez, como alguns sugerem, o mais antigo animal domesticado pelo ser humano, considerado até como o melhor amigo do homem. São verdadeiros animais sociais dotados de capacidades que lhes permitem desempenhar tarefas específicas, bem para além de um mero animal de companhia<sup>1</sup>, sendo referidos por muitos como o animal com maior capacidade de empatia para connosco, porque são capazes de entender os sentimentos e emoções de humanos (donos ou próximos) melhor que qualquer outro animal.

Efetivamente o mundo canino fascina-me, e dado que a prevalência de neoplasias em canídeos tem vindo a aumentar, isto motivou-me a participar num projeto de investigação no âmbito da Oncologia Veterinária.

O diagnóstico do cancro parece, sem prejuízo de melhores resultados, suficientemente desenvolvido para se conhecer fortes evidências nomeadamente em exames imagiológicos, análises histopatológicas, análises sanguíneas entre outras. Contudo, o sucesso do tratamento pode depender de muitas variáveis, como por exemplo da doença e do estágio da mesma, assim como, do tipo de terapêutica utilizada e da sua eficácia. Por esses factos, tal evidência levou-me a orientar o esforço da investigação para o tratamento, em particular a imunoterapia, uma vez que esta oferece perspetivas muito interessantes de desenvolvimentos futuros, nomeadamente em medicina humana, porque permite localizar e eliminar as células malignas, não afetando as células de tecidos normais (Guth & Dow, 2013).

As dúvidas do que pretendia investigar ficaram dissipadas com a constatação de que em Oncologia tem sido reconhecida a relevância do cão como modelo para o homem, visto que os cancros que ocorrem naturalmente em ambos podem apresentar o mesmo comportamento biológico, alvos moleculares, genética, forma histológica e resposta ao tratamento. Deste modo, estes animais podem contribuir de forma muito importante para o desenvolvimento de novos tratamentos contra o cancro (Paoloni & Khanna, 2008).

Estes estudos estão integrados numa ciência denominada Oncologia Comparada, e possibilitam a investigação da epidemiologia, genética, etc. do cancro. Desta forma, as descobertas científicas da medicina humana e veterinária podem ser combinadas de forma a descobrir novos tratamentos que possam beneficiar ambas (Schiffman & Breen, 2015).

Realça-se, que na investigação científica, a escolha da espécie canina para realizar a translação de novos tratamentos para os humanos resulta do facto de existirem bastantes

---

<sup>1</sup> O cão pode ser treinado para busca e salvamento, para guias de invisuais e de pessoas com autismo, epilepsia, entre outros.

semelhanças a nível de fisiologia e anatomia entre ambos, mas também por existirem um grande número de cães diagnosticados com cancro (Paoloni & Khanna, 2008). Outros argumentos prendem-se com o facto dos cães, como animais de estimação, fazerem parte do ambiente humano, sendo os fatores de risco ambientais semelhantes. Além disso, nos estudos com animais a regulamentação é menos exigente, autorizando a amostragem de tumores em série. Acresce que, o mapeamento genético efetuado em determinadas raças de cães proporciona a deteção dos genes com predisposição para o linfoma, e a reduzida esperança média de vida nestes animais comparativamente ao homem, possibilita uma duração dos estudos de investigação significativamente mais curta (Parker *et al.*, 2004; Richards & Suter, 2015).

No futuro, e em parte sobretudo pelo referido, é expectável que os animais de companhia sejam considerados essenciais no processo de desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que o gradual acesso a bancos caninos de tumores irá rapidamente possibilitar o reconhecimento de alvos tumorais. Portanto, crê-se que a formação de mais equipas de investigação dispostas a realizar estudos cujos resultados possam ser transferidos para medicina humana, vai permitir melhorar os cuidados de saúde disponibilizados a humanos e cães com cancro (Paoloni & Khanna, 2008).

### **Estrutura do trabalho**

A dissertação será desenvolvida ao longo de 6 capítulos. No 1º capítulo estão descritas as atividades de estágio, no 2º capítulo é feita a introdução, no 3º capítulo é elaborada a revisão bibliográfica do linfoma B canino nomeadamente caracterização, diagnóstico, tratamento, prognóstico e relevância da imunoterapia. Os capítulos 4 e 5 são a essência da investigação laboratorial em que respetivamente no 4º capítulo é relatada a metodologia científica e no 5º capítulo são apresentados os resultados e a sua discussão.

Finalmente, no capítulo 6, termina-se com a conclusão e perspetivas futuras em que se procura dar relevância à possibilidade de continuidade do estudo desenvolvido.

### Capítulo III - Revisão bibliográfica sobre o linfoma B canino

O estudo do linfoma é de extrema importância, dado que se trata do tumor maligno mais frequente nos cães, sendo que aproximadamente 70% derivam de células B (Modiano *et al.*, 2005). Estes linfomas têm origem em células linforeticulares, e surgem normalmente nos tecidos linfóides como os linfonodos e baço, contudo têm a capacidade de surgir em qualquer tecido do corpo.

O linfoma canino é muito semelhante ao linfoma não-Hodgkin humano, em termos de apresentação clínica, biologia molecular, tratamento e resposta ao mesmo, e em ambos os linfomas o número de casos tem aumentado nas últimas décadas (Cartwright *et al.*, 1999; Merlo *et al.*, 2008; Vail & MacEwen, 2000; Vail, Pinkerton & Young, 2013). Todos estes fatores juntamente com um *pool* genético reduzido nos cães, um genoma já sequenciado e a adesão da parte dos donos ao tratamento, tornam o linfoma nestes animais num bom modelo de estudo para o linfoma não-Hodgkin dos humanos (Zandvliet, 2016).

#### 1. Epidemiologia

Todas as raças podem apresentar esta doença, mas os cães de porte médio a grande são os mais afetados, pela sua maior susceptibilidade genética (Edwards, Henley, Harding, Dobson & Wood, 2003; Villamil *et al.*, 2009). Algumas das raças de cães mais afetadas pelo linfoma B são o Scottish Terrier, Basset Hound, Doberman Pinscher, Border Collie e o Cavalier King Charles Spaniel (Modiano *et al.*, 2005; Teske, de Vos, Egberink & Vos, 1994a; Villamil *et al.*, 2009).

A taxa de incidência anual mínima estimada de linfoma de células B é de 13-114 casos por cada 100 000 cães (Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002), sendo que esta aumenta com a idade do animal, atingindo maioritariamente animais de meia-idade a idosos (Zandvliet, 2016). No entanto, apesar de não existirem diferenças óbvias de predisposição entre machos e fêmeas, estas últimas aparentam ter menor risco de desenvolver a doença se não forem esterilizadas (Villamil *et al.*, 2009). No caso específico do Golden Retriever e do Vizla, a realização da esterilização antes do primeiro ano de idade pode aumentar este risco (Torres de la Riva *et al.*, 2013; Zink *et al.*, 2014), o que não acontece no Labrador Retriever (Hart, Hart, Thigpen & Willits, 2014).

## 2. Etiologia

A etiologia do linfoma canino é multifatorial. Os animais que vivem em áreas industriais, poluídas, com radiação, perto de incineradores de lixo, que estejam expostos a químicos ou a campos magnéticos, manifestam um risco acrescido de desenvolver linfoma (Gavazza, Presciuttini, Barale, Lubas & Gugliucci, 2001; Marconato *et al.*, 2009; Pastor *et al.*, 2009; Reif, Lower & Ogilvie, 1995; Takashima-Uebelhoer *et al.*, 2012).

Tem sido possível constatar também, que o linfoma canino à semelhança do linfoma humano detém irregularidades genéticas específicas, todavia esta informação em medicina veterinária é ainda limitada (Elvers *et al.*, 2015; Frantz *et al.*, 2013; Kluin & Schuurin, 2011; Richards *et al.*, 2013). Como aberrações cromossômicas mais frequentes foram identificadas um ganho do cromossoma 13 e 31 e uma perda do cromossoma 14 (Thomas, Smith, Ostrander, Galibert & Breen, 2003), tendo sido igualmente demonstrado que a trissomia do cromossoma 13 permitia que a duração da primeira remissão e tempo de sobrevivência aumentasse, influenciando desta forma o prognóstico do animal (Hahn, Richardson, Hahn & Chrisman, 1994).

Deficiências na reparação do ADN (Thamm *et al.*, 2013), alterações no gene tumoral supressor p53 (Nasir & Argyle, 1999; Setoguchi *et al.*, 2001; Sokolowska, Cywinska & Malicka, 2005; Sueiro, Alessi & Vassallo, 2004; Veldhoen, Stewart, Brown & Milner, 1998), hipometilação de ADN (Pelham, Irwin & Kay, 2003), assim como um aumento da expressão do gene no qual atua o NF- $\kappa$ B<sup>2</sup>, que controla a proliferação celular e a apoptose (Mudaliar *et al.*, 2013; Richards *et al.*, 2013), entre outras alterações, foram relatadas no linfoma humano, assim como no canino.

Existe também um risco hereditário, porque raças distintas apresentam diferente prevalência desta doença, como referido anteriormente (Modiano *et al.*, 2005).

Embora tenha sido detetada serologicamente uma infecção pelo vírus Epstein-Barr em vários casos de linfoma canino, continua a ser necessária mais investigação antes de se poder aceitar como causa viral (Chiou, Chow, Yang, Chiang & Lin, 2005; Huang *et al.*, 2012; Milman, Smith & Erles, 2011).

Importa também referir que alterações do sistema imunitário do cão, como doenças imunomediadas, aumentam o risco de desenvolver linfoma (Foster, Sturgess, Gould, Iwasaki & Day, 2000; Keller, 1992), existindo um caso de um cão que desenvolveu linfoma depois de um tratamento com ciclosporina (Blackwood, German, Stell & O'Neill, 2004).

---

<sup>2</sup> Fator nuclear kappa B faz parte da via de sinalização pró-inflamatória.

### **3. Classificação**

A classificação do linfoma pode ser realizada segundo os critérios histológicos, as características imunofenotípicas e a localização anatômica.

#### **3.1. Classificação anatômica**

Esta forma de classificação permite categorizar os linfomas em generalizado (ou multicêntrico), digestivo (ou gastrointestinal), tímico (ou mediastínico), cutâneo e outros, conforme a localização anatômica dos órgãos afetados (tabela 2).

O linfoma multicêntrico é a forma clínica mais comum de linfoma canino, representando cerca de 80% dos casos, sendo caracterizado pela presença de linfadenopatia superficial (figura 1) (Ponce *et al.*, 2010; Vail *et al.*, 2013; Vezzali, Parodi, Marcato & Bettini, 2009). Este tipo de linfoma atinge os linfonodos periféricos e possui cinco estádios definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (tabela 3) (Owen, 1980).

Outras formas clínicas extranodais, tais como o linfoma hepático (Dank *et al.*, 2011) e cutâneo (Day, 1995), têm maioritariamente origem nas células T, à semelhança do linfoma mediastínico (Day, 1997) e gastrointestinal (Steinberg, Dubielzig, Thomson & Dzata, 1995).

O linfoma primário ocular é geralmente de células B, estando normalmente associado a uveíte secundária (Massa, Gilger, Miller & Davidson, 2002). Ao contrário do linfoma ocular que ocorre raramente, o linfoma pulmonar é frequente, e pode ser primário ou secundário a qualquer forma de linfoma canino (Yohn *et al.*, 1994).

As formas atípicas de linfoma foram descritas como oral (Ito *et al.*, 2007), nasal (Kaldrymidou *et al.*, 2000), coanal (Shankel, 2005), vertebral (Lamagna, Lamagna, Meomartino, Paciello & Fatone, 2006; Vascellari *et al.*, 2007), esquelética (Dhaliwal, Reed & Kitchell, 2001), do músculo esquelético (Takeuchi *et al.*, 2010), da membrana sinovial (Lahmers *et al.*, 2002), adrenal (Labelle & De Cock, 2005), renal (Durno, Webb, Gauthier & Bienzle, 2011), da bexiga (Kessler, Kandel-Tschiederer, Pfleghaar, & Tassani-Prell, 2008), uterina (Ko, Kim, Han & Do, 2013), prostática (Assim, Baldi, Citro & Spugnini, 2008; Winter, Locke & Penninck, 2006), cardíaca e com envolvimento pericárdico (Aupperle *et al.*, 2007; MacGregor *et al.*, 2005).

Tabela 2: Classificação Anatômica (Owen, 1980).

A	Generalizado
B	Digestivo
C	Tímico
D	Cutâneo
E	Outros

Tabela 3: Estádios segundo a Organização Mundial de Saúde (Owen, 1980).

Estádio

I	Um único linfonodo afetado ou apenas o tecido linfóide de um órgão afetado <sup>2</sup>
II	Vários linfonodos afetados numa determinada área do corpo ( $\pm$ tonsilas)
III	Linfadenopatia não dolorosa, difundida pelo corpo do animal
IV	Envolvimento do fígado e baço ( $\pm$ estágio I-III)
V	Envolvimento do sangue e/ou medula óssea entre outros órgãos ( $\pm$ estádios I-IV)

<sup>2</sup>Com exceção da medula óssea.

Sub-estádio

a	Ausência de sinais sistêmicos
b	Presença de sinais sistêmicos (febre, perda de peso ou hipercalcemia)

### 3.2. Apresentação clínica

Os sinais clínicos mais frequentes são linfadenomegália generalizada, anemia, caquexia, letargia, anorexia, poliúria/polidipsia, febre, vômito, diarreia, melena e dispneia (Vail & Thamm, 2005; Vail *et al.*, 2013).

Como síndromes paraneoplásicas podem ocorrer doenças imunomediadas como por exemplo, a anemia hemolítica imunomediada (Day, 1996), trombocitopenia imunomediada (Keller, 1992), e polimiosite (Evans, Levesque & Shelton, 2004). A hipercalcemia ocorre muito raramente nos casos de linfoma B (Messinger, Windham & Ward, 2009), ao contrário da gamopatia monoclonal que é mais frequente (Giraudel, Pages & Guelfi, 2002; Seelig, Perry, Zaks, Avery & Avery, 2011; Tappin *et al.*, 2011).



Figura 1: Cão com linfadenopatia submandibular evidente, resultante de linfoma multicêntrico (Vail *et al.*, 2013).



### 3.3. Classificação citológica, histológica e imunofenotípica

O sistema de classificação do *National Cancer Institute* (NCI) e o sistema de Kiel (tabela 4) foram ajustados ao linfoma canino a partir do linfoma não-Hodgkin humano, de modo a poder classificar os diversos tipos de linfoma, com base nas características morfológicas e imunofenotípicas das células linfóides que os constituem (Ettinger, 2003; Morris & Dobson, 2001; Vail *et al.*, 2013).

A classificação de Kiel atualizada permite classificar linfomas segundo o fenótipo imunológico (células B ou T), a morfologia (centroblástico, centrocítico ou imunoblástico) e o padrão arquitetural do tumor (difuso e folicular). Por seu lado no NCI *Working Formulation* não é possível categorizar o fenótipo imunológico, mas apenas o padrão difuso ou folicular do tumor e o tipo de células (grandes células, pequenas células edentadas, imunoblástico).

Os tumores podem ser classificados como linfomas de baixo grau, grau intermédio e alto grau de malignidade em ambos os sistemas. Os linfomas de alto grau possuem um índice mitótico elevado, e tem maior probabilidade de responder inicialmente à quimioterapia, sendo os mais comuns. Ao contrário dos de baixo grau, os menos comuns (5.3% a 29%), que são constituídos por células pequenas com um índice mitótico baixo, e progridem lentamente (Flood-Knapik *et al.*, 2013; Valli, Vernau, de Lorimier, Graham & Moore, 2006).

Além disso, foi divulgado pela OMS, um outro sistema, que integrava características histológicas, imunofenotípicas e anatómicas (tabela 5). De acordo com este sistema, o linfoma difuso de grandes células B é a forma de linfoma canino mais frequente (54%) (Carter, Valli &

Lumsden, 1986; Harris *et al.*, 1999; Valli *et al.*, 2011; Valli, Kass, San Myint & Scott, 2013; Vezzali *et al.*, 2009).

Relativamente ao imunofenótipo parece existir uma diferença entre raças, nomeadamente o Cocker Spaniel e o Doberman Pinscher que apresentam maior probabilidade de desenvolver linfoma B, enquanto o Golden Retriever apresenta igual probabilidade de desenvolver linfoma B ou T, ao contrário do Boxer que é mais propenso a desenvolver linfoma T (Modiano *et al.*, 2005).

Tabela 4: Sistema de classificação de Kiel. Adaptado de Ettinger (2003).

Grau	Classificação de Kiel
Baixo	Linfocítico
	Linfoplasmocítico
	Centrocítico
Intermédio	Centroblástico-centrocítico
Alto	Centroblástico
	Linfoblástico de células B
	Linfoblástico de células T
	Imunoblástico

Tabela 5: Classificação das neoplasias das células B segundo a Organização Mundial de Saúde. Adaptado de Vail *et al.* (2013).

#### Neoplasias das células B

Leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras
Leucemia linfocítica crónica de células B / Linfoma linfocítico de pequenas células
Linfoma linfocítico de tipo intermédio
Linfoma linfoplasmocítico
Linfoma de células do manto
Linfoma folicular de células centrais
Linfoma da zona marginal
Mieloma de células plasmáticas/Plasmocitoma
Linfoma difuso de grandes células B
Linfoma de células B rico em células T
Linfoma imunoblástico de grandes células
Linfoma mediastínico (tímico) de grandes células B
Linfoma/leucemia de Burkitt

## **4. Diagnóstico**

O ideal será começar pela anamnese, depois realizar o exame físico, seguindo-se a recolha de sangue e a punção aspirativa com agulha fina (PAAF) dos linfonodos, e só se necessário também a recolha de medula óssea (Vail *et al.*, 2010).

### **4.1. Exame físico**

Este exame deve incluir a palpação de todos os linfonodos acessíveis e um exame retal, uma vez que os animais afetados poderão ter aglomerados de linfócitos neoplásicos na forma de pólipos. A observação das mucosas constitui também uma parte importante do exame, pois podem apresentar anemia, icterícia, petéquias e ulceração, indicativos de patologias subjacentes como a anemia, trombocitopénia, urémia entre outras (Vail *et al.*, 2013).

Durante a palpação abdominal pode-se suspeitar de organomegália, espessamento das paredes intestinais, ou linfadenopatia mesentérica, enquanto na auscultação torácica é possível suspeitar de uma efusão pleural ou de uma massa mediastínica (Vail *et al.*, 2013).

Por último, não deve ser esquecido o exame ocular porque os animais com linfoma podem apresentar uveíte, hemorragia ou infiltração ocular (Massa *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013).

### **4.2. Alterações laboratoriais**

A maioria dos animais com linfoma pode apresentar anemia, geralmente normocrómica e normocítica (não regenerativa), contudo a anemia também pode ser regenerativa e subsequente a hemorragias ou a uma anemia hemolítica imunomediada (Day, 1996). Portanto, nestes casos é recomendado realizar uma contagem de plaquetas e de reticulócitos, assim como um teste de coagulação (Vail *et al.*, 2013).

Para além da anemia, os cães diagnosticados com linfoma podem apresentar trombocitopénia, neutrofilia e linfocitose (Gavazza, Lubas, Valori & Gugliucci, 2008; Grindem, Breitschwadt, Corbett, Page & Jans, 1994).

A medula óssea pode também ter sido afetada se os linfócitos circulantes apresentarem formas anormais, no entanto não é possível prever com precisão este envolvimento através de contagens do sangue periférico, sendo necessário uma citologia de um aspirado de medula óssea (Aubry, Spangler, Schleis & Smith, 2014; Martini, Melzi, Comazzi & Gelain, 2013).

Quanto à proteinúria, embora esta possa estar presente nos linfomas caninos multicêntricos, não produz grande impacto no prognóstico, portanto não é necessário realizar urianálises frequentemente (Di Bella *et al.*, 2013).

No que toca aos níveis de proteína séricos, estes podem estar significativamente elevados no linfoma de células B devido a gamopatia monoclonal.

### 4.3. Análise citológica e histopatológica dos linfonodos

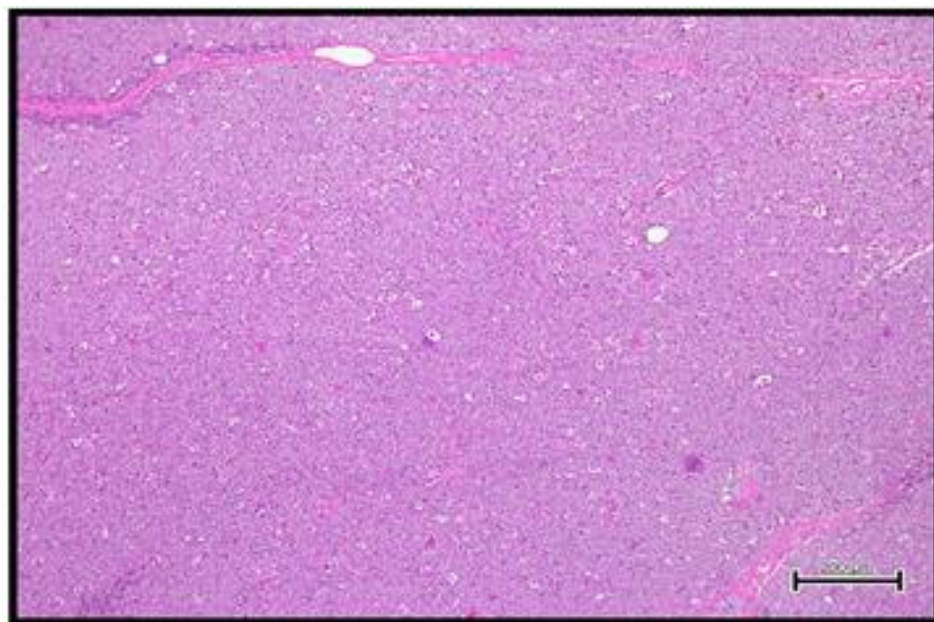
O exame dos linfonodos pré-escapulares ou poplíteos é essencial no diagnóstico de linfoma, devendo ser evitada a análise dos linfonodos mandibulares porque são mais reativos.

A partir das PAAF's dos linfonodos podem ser realizadas citologias, sendo este método bastante rápido, pouco invasivo e sensível no diagnóstico dos linfomas de alto grau. As células observadas são habitualmente grandes células linfóides com três a cinco nucléolos visíveis e um citoplasma basófilo, ou com cromatina fina sem que seja possível distinguir o nucléolo. No entanto, nos casos de citologias de células pequenas é difícil concluir se é um linfoma (Sozmen *et al.*, 2005; Teske & van Heerde, 1996).

Todavia, a biópsia excisional dos linfonodos afetados e a posterior análise histopatológica possibilita uma classificação mais específica (padrão de crescimento, dimensão e forma do núcleo, índice mitótico e imunofenótipo), sendo o método de eleição (figura 2) (Zandvliet, 2016). Neste processo, o linfonodo inteiro juntamente com a cápsula deve ser removido e colocado em formol.

Adicionalmente podem ser realizadas PAAF's ecoguiadas do baço, fígado e linfonodos abdominais, contudo se o tecido esplênico se apresentar normal na ecografia, a citologia não vai ser vantajosa para o diagnóstico de linfoma (Crabtree, Spangler, Beard & Smith, 2010; Kinns & Mai, 2007; Nyman *et al.*, 2006).

Figura 2: Histopatologia de linfoma difuso de células grandes do biobanco (HE, 40X) (Tese de Doutoramento de Joana Dias).



#### **4.4. Técnicas de diagnóstico molecular**

Outras técnicas podem ser utilizadas para classificar e caracterizar linfomas, tais como os biomarcadores, o PARR e a imunofenotipagem. Amostras de sangue periférico, linfonodos, tecidos não-linfóides e efusões podem ser analisadas quando não é possível obter um diagnóstico conclusivo apenas com exames citológicos e histopatológicos.

A imunofenotipagem é utilizada para determinar o tipo de células que fazem parte do tumor, e pode ser realizada com amostras citológicas e histológicas. Além de que a partir das PAAF e de células individuais presentes num meio fluido podem também ser realizadas citometrias de fluxo.

Uma vez que as características morfológicas, como a localização anatômica, não são determinantes do imunofenótipo das células tumorais, deve-se recorrer ao uso de anticorpos para uma identificação mais precisa. Os anticorpos mais utilizados para o linfoma B são o CD20, CD21, CD79 $\alpha$ , e o PAX5 (Caniatti, Roccabianca, Scanziani, Paltrinieri & Moore, 1996; Culmsee, Simon, Mischke & Nolte, 2001; Gelain, Mazzilli, Riondato, Marconato & Comazzi, 2008; Milner, Pearson, Nesbit & Close, 1996). No entanto, algumas células tumorais podem expressar marcadores de células B e T (Wilkerson *et al.*, 2005). Além disto, existe ainda a possibilidade de utilizar estes anticorpos no tratamento do linfoma.

O PCR, por sua vez, é utilizado para amplificar as regiões variáveis dos genes das imunoglobulinas e desta forma permite detetar nos cães a presença de populações de clones de linfócitos (Avery A., 2009). A técnica de PCR mais usada denomina-se PARR, apesar de ser bastante sensível e específica, não deve ser usada de forma habitual no diagnóstico e estadiamento do linfoma porque não é tão precisa como a técnica anterior (Burnett *et al.*, 2003; Flory, Rassnick, Stokol, Scrivani & Erb, 2007; Lana, Jackson, Burnett, Morley & Avery, 2006; Thalheim, Williams, Borst, Fogle & Suter, 2013).

Por fim, os biomarcadores, que consistem em proteínas séricas, podem ser utilizados para avaliar a resposta ao tratamento e para diagnosticar determinadas doenças malignas. Ultimamente tem surgido mais investigação nesta área, para que se possam identificar potenciais biomarcadores específicos de cães, contudo ainda não se tornaram relevantes a nível clínico (Atherton *et al.*, 2013; Gaines *et al.*, 2007; McCaw *et al.*, 2007; Ratcliffe *et al.*, 2009).

#### **5. Estadiamento**

É necessário determinar o estágio clínico da doença após o diagnóstico ter sido realizado.

Atualmente utiliza-se o sistema de estadiamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) (tabela 3). Sendo que os estádios III e IV são os mais comuns na clínica, representando aproximadamente 80% dos casos de cães com linfoma (Vail *et al.*, 2013).

### **5.1. Imagiologia**

Pode ser recomendado efetuar radiografias ao tórax para detetar linfadenopatia, infiltrados pulmonares e massas mediastínicas craniais (Starrak, Berry, Page, Johnson & Thrall, 1997). Enquanto a ecografia abdominal permite avaliar o fígado, o baço e o tamanho e a forma dos linfonodos abdominais e periféricos (Crabtree *et al.*, 2010; Nyman *et al.*, 2006; Nyman, Kristensen, Skovgaard & McEvoy, 2005). No entanto, embora ambos os exames anteriores permitam um estadiamento mais eficiente, não devem ser realizadas em todos os casos, uma vez que só afetam o prognóstico se detetarem a presença de uma massa mediastínica cranial (Flory *et al.*, 2007; Starrak *et al.*, 1997).

Na medicina humana realizam-se rotineiramente tomografias computadorizadas com emissão de positrões (PET-CT), uma vez que são o método ideal para estadiamento da doença. Em medicina veterinária o uso desta tecnologia e da cintigrafia é bastante escasso, não por questões de eficácia mas de custos e de disponibilidades de meios, tendo sido utilizadas apenas nalguns casos excecionais para estimar a extensão da doença e monitorizar a resposta ao tratamento (Ballegeer, Hollinger & Kunst, 2013; Lawrence *et al.*, 2009; LeBlanc, Jakoby, Townsend & Daniel, 2009; Statham-Ringen *et al.*, 2012).

### **5.2. Avaliação da medula óssea**

Uma vez que a afetação da medula óssea pode ter influência sobre o prognóstico, uma punção ou biópsia de medula óssea também é recomendada. No entanto, como os resultados não são determinantes na escolha do tratamento, esta não deve ser realizada de forma rotineira (Martini *et al.*, 2013; Vail *et al.*, 2010).

### **5.3. Análise citológica**

A partir de PAAFs de órgãos como os linfonodos, fígado, baço ou a partir do sangue, podem ser realizadas citologias, sendo que estas constituem a técnica de estadiamento mais utilizada. Também se pode recorrer a técnicas como o PARR ou a citometria de fluxo, contudo a análise citológica produz uma estimativa mais exata do prognóstico (Burnett *et al.*, 2003; Joetzke, Eberle, Nolte, Mischke & Simon, 2012; Lana *et al.*, 2006).

## 6. Tratamento

O estágio e sub-estágio da doença, a presença de síndromes paraneoplásicas, assim como a “compliance” dos donos podem influenciar o tratamento indicado para cada animal.

Tendo em conta que o linfoma canino é uma doença sistémica, o tratamento deve também ser sistémico, e se os animais não forem tratados podem morrer em 4 a 6 semanas depois do diagnóstico (Vail *et al.*, 2013).

### 6.1. Quimioterapia

Atualmente utiliza-se quimioterapia como forma de tratamento desta patologia em animais, sendo um dos objetivos induzir uma remissão completa (tabela 6) de pelo menos 6 meses, ou voltar a induzir a remissão quando ocorre recidiva do linfoma (Vail *et al.*, 2013).

Tabela 6: Tipos de resposta ao tratamento de determinada doença. Adaptado de Ettinger (2003).

Resposta	Definição
Remissão completa	100% de redução da doença mensurável
Remissão parcial	>50% e <100% de redução da doença mensurável
Doença estável	<50% de redução da doença mensurável ou sem modificações ou novas lesões
Doença progressiva	>25% de aumento da doença mensurável ou novas lesões

Antes de se iniciar a quimioterapia deve ser realizado um hemograma, sendo que os mínimos devem ser 1500 neutrófilos/ $\mu$ L e 50 000 plaquetas/ $\mu$ L. Se a contagem de neutrófilos não atingir o mínimo aceitável deve-se aguardar 5 a 7 dias antes de realizar o tratamento com os quimioterápicos mielosupressores, e eventualmente estimular com o fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Vail *et al.*, 2013).

O protocolo CHOP (Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisolona) é o mais utilizado (tabela 7). No entanto, a quimioterapia com um único fármaco também consiste numa opção de tratamento. Contudo os protocolos combinados como o CHOP produzem uma taxa de resposta mais elevada e uma maior duração do período de remissão nos casos de linfoma de alto grau (Valli *et al.*, 2013).

Tabela 7: Protocolo de quimioterapia curto da Universidade de Wisconsin Madison (Vail *et al.*, 2013).

Semana 1	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV) Prednisolona (2 mg/kg PO q24h)
Semana 2	Ciclofosfamida <sup>a</sup> (250 mg/m <sup>2</sup> EV) Prednisolona (1,5 mg/kg PO q24h)
Semana 3	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV) Prednisolona (1 mg/kg PO q24h)
Semana 4	Doxorrubicina <sup>b</sup> (30 mg/m <sup>2</sup> EV) Prednisolona (0,5 mg/kg PO q24h)
Semana 6	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 7	Ciclofosfamida <sup>a</sup> (250 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 8	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 9	Doxorrubicina <sup>b</sup> (30 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 11	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 12	Ciclofosfamida <sup>a</sup> (250 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 13	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 14	Doxorrubicina <sup>b</sup> (30 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 16	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 17	Ciclofosfamida <sup>a</sup> (250 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 18	Vincristina (0,7 mg/m <sup>2</sup> EV)
Semana 19	Doxorrubicina <sup>b</sup> (30 mg/m <sup>2</sup> EV)

<sup>a</sup> administração de furosemida (1 mg/kg EV) juntamente com ciclofosfamida, para reduzir o risco de cistite hemorrágica estéril.

<sup>b</sup> em cães com <15 kg de peso corporal, a dose de doxorrubicina de 1 mg/kg é substituída por 30 mg/m<sup>2</sup>.

A administração de glucorticóides antes do início do protocolo CHOP diminui a taxa de resposta e encurta o período de remissão (Gavazza *et al.*, 2008; Marconato *et al.*, 2011; Price, Page, Fischer, Levine & Gerig, 1991; Teske *et al.*, 1994b). De igual forma, o uso de prednisolona antes do tratamento também não aumenta a eficácia deste, e deve ser apenas utilizada em protocolos de resgate, quando ocorre recidiva ou o linfoma deixa de responder ao protocolo de primeira linha (Zandvliet, Rutteman & Teske, 2013).

Foi estabelecido como tratamento de rotina, um protocolo de 6 meses (Chun, Garrett & Vail, 2000; Garrett *et al.*, 2002; Piek, Rutteman & Teske, 1999) que consiste numa primeira fase de indução (origina uma remissão completa) que daria lugar a uma fase mais curta de



manutenção. No entanto, protocolos com 12 semanas (Simon *et al.*, 2006) e 15 semanas (Burton, Garrett-Mayer & Thamm, 2013) são igualmente eficazes.

Com estes protocolos combinados de quimioterapia, um animal com linfoma pode sobreviver 10 a 14 meses, sendo que aproximadamente 10% conseguem viver até dois anos (Garrett *et al.*, 2002). Embora a maioria destes animais alcance a remissão do linfoma, eventualmente sofrem uma recidiva, causada pela resistência do tumor aos quimioterápicos, por uma dosagem e frequência de administração inapropriada ou pelo tratamento prévio com glucocorticóides.

Nestes casos torna-se necessário utilizar protocolos de resgate, que podem incluir quimioterapia com um único fármaco ou uma combinação de vários fármacos, no entanto originam geralmente taxas de resposta mais baixas e períodos de remissão menores (Dervisis *et al.*, 2007; Griessmayr, Payne, Winter, Barber & Shofer, 2009; Moore, Ogilvie & Vail, 1994; Saba, Thamm & Vail, 2007; Saba, Hafeman, Vail & Thamm, 2009).

Quando uma recidiva ocorre pelo menos dois meses após o protocolo inicial ter terminado, existe a possibilidade de repetir o protocolo de indução. Caso contrário, será necessário o uso de fármacos alternativos, tais como actinomicina D (Bannink, Sauerbrey, Mullins, Hauptman & Obradovich, 2008), mitoxantrona (Lucroy, Phillips, Kraegel, Simonson & Madewell, 1998), doxorubicina (se não tiver feito parte do protocolo de indução), decarbazina (Van Vetchten, Helfand & Jeglum, 1990), lomustina (Moore *et al.*, 1999), L- asparaginase, prednisolona e o protocolo MOPP (Rassnick *et al.*, 2002; Vail *et al.*, 2013).

No caso de linfomas de baixo grau, é importante monitorizar a doença, tendo como opção de tratamento clorambucil e prednisolona se desejado, ou apenas esplenectomia nos casos de linfoma esplênico da zona marginal (Flood-Knapik *et al.*, 2013; O'Brien *et al.*, 2013; Stefanello *et al.*, 2011; Valli *et al.*, 2006).

A eficácia da quimioterapia está limitada por alguns fatores, como a resistência aos fármacos quimioterápicos e o pequeno leque de opções de tratamento. Esta resistência pode ser intrínseca às células tumorais ou pode desenvolver-se depois da exposição a quimioterápicos, sendo os principais responsáveis alguns membros da superfamília de proteínas transportadoras do tipo ABC (ATP-binding cassette), tais como a glicoproteína p (ABCB1) (Bergman, Ogilvie & Powers, 1996; Lee, Hughes, Fine & Page, 1996; Mealey *et al.*, 2008).

## **6.2. Radioterapia**

Nos casos de linfoma localizados, como por exemplo, nas formas extranodais, e até mesmo nos linfomas multicêntricos, a radioterapia pode ser uma opção de tratamento, juntamente com a quimioterapia sistémica (Berlato, Schrempp, Van Den Steen & Murphy, 2012; Kessler *et al.*, 2008).

Existem como opções de tratamento do linfoma multicêntrico, a irradiação da totalidade do corpo numa dose única com transplante de medula óssea ou irradiação do corpo em duas sessões separadas, seguida de quimioterapia (Gustafson, Lana, Mayer & LaRue, 2004; Laing *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 2004).

## 7. Prognóstico

Muitos fatores estão envolvidos na avaliação do prognóstico, mas o imunofenótipo e sub-estádio são dos mais utilizados, sendo que o linfoma B canino tem períodos de remissão e tempo de sobrevivência maiores que o linfoma T.

Os animais que expressem níveis menores de antigénio B5, presente em 95% dos linfócitos não neoplásicos, e de MHC de classe II possuem períodos de remissão e taxas de sobrevivência menores. Também os animais com o estágio I ou II, e sub-estádio a têm melhor prognóstico que animais com estádios mais avançados e sub-estádio b (Greenlee *et al.*, 1990; Jagielski, Lechowski, Hoffmann-Jagielska & Winiarczyk, 2002; Keller, MacEwen, Rosenthal, Helfand & Fox, 1993; Ponce *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2011; Ruslander, Gebhard, Tompkins, Grindem & Page, 1997; Teske *et al.*, 1994b; Valli *et al.*, 2013).

Do mesmo modo, o grau de linfoma também pode afetar o prognóstico, uma vez que os linfomas de alto grau ou intermédio habitualmente respondem à quimioterapia porém podem recidivar rapidamente, enquanto os linfomas de baixo grau tendem a comportar-se de forma oposta (Flood-Knapik *et al.*, 2013; Stefanello *et al.*, 2011; Valli *et al.*, 2006).

O sexo do animal também influencia o prognóstico, uma vez que as fêmeas esterilizadas tendem a ter um melhor prognóstico que os machos (Keller *et al.*, 1993; MacEwen, Hayes, Matus & Kurzman, 1987).

No que respeita ao tratamento, a administração de glucocorticóides antes da quimioterapia, e a ausência de resposta ou a recidiva no início do tratamento afeta também o prognóstico (Gavazza *et al.*, 2008; Marconato *et al.*, 2011; Price *et al.*, 1991; Teske *et al.*, 1994b).

Por fim, os índices proliferativos AgNOR (regiões organizadoras nucleolares argirofílicas) e Ki67<sup>3</sup> podem ser avaliados em amostras histológicas e citológicas, tendo uma expressão aumentada no linfoma canino, permitindo obter mais informação prognóstica (Bauer, Zervos & Moritz, 2007; Kiupel, Teske & Bostock, 1999; Vajdovich, Psáder, Tóth & Perge, 2004; Valli *et al.*, 2013). Inclusive, biomarcadores, como por exemplo os níveis de TK1 no soro, de proteína C reativa do soro, e de haptoglobulina, também podem ser utilizados na previsão do prognóstico (Alexandrakis *et al.*, 2014; von Euler, Einarsson, Olsson, Lagerstedt & Eriksson, 2004).

---

<sup>3</sup> Proteína usada como marcador de proliferação celular.

## 8. Imunoterapia

A resistência aos fármacos anti-neoplásicos e a toxicidade destes revela a necessidade de investigação e desenvolvimento de outras formas de tratamento, como por exemplo a imunoterapia (Lage, 2008). Esta toxicidade provocada pela quimioterapia advém em parte da inespecificidade deste tratamento, que atinge ambas as células tumorais e saudáveis. A imunoterapia, por outro lado, alcança um alvo específico e promove ou complementa a resposta do sistema imunitário, com o mínimo de efeitos secundários possível (Brody, Kohrt, Marabelle & Levy, 2011).

Uma vez que o sistema imunitário é capaz de eliminar células malignas, há a possibilidade deste ser explorado para descobrir uma forma de tratar o cancro. Podendo uma resposta imunitária eficaz resultar numa remissão espontânea de tumores sem que haja tratamento (Guth & Dow, 2013).

Este processo começa quando são gerados antígenos estranhos ao organismo, para que as células que os apresentam na sua superfície possam ser detetadas e eliminadas (Farkona, Diamandis & Blasutig, 2016). Estes antígenos tumorais podem constituir proteínas próprias do organismo cuja forma sofreu uma alteração ou que suportaram mutações durante a formação dos tumores (Guth & Dow, 2013).

De facto, podem ser encontradas células T específicas de tumores, que são responsáveis pelo reconhecimento das células tumorais, em tecidos cancerígenos e nos linfonodos onde os tumores drenam (Guth & Dow, 2013).

A vigilância imunitária consiste então neste processo de reconhecimento e destruição pelo sistema imunitário, de células próprias do organismo que sofreram alterações (Schreiber & Podack, 2009). Esta teoria compreende três etapas, a identificação e eliminação pelo sistema imunitário de células neoplásicas, o equilíbrio entre o crescimento tumoral, devido à resistência de algumas células tumorais, e a destruição das células susceptíveis pelo sistema imunitário, e por último a evasão das células cancerígenas ao sistema imunitário, permitindo o crescimento do tumor e a formação de metástases (Schreiber & Podack, 2009, Vinay *et al.*, 2015).

Os processos de imunossupressão pelos quais as células neoplásicas escapam à vigilância imunitária podem envolver células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), que após a formação de tumores, são libertadas da medula óssea para o sangue como formas imaturas de monócitos e granulócitos. Estas células têm a capacidade de diminuir a resposta imunitária contra o tumor, e de favorecer a invasão tumoral e a metastização (Ye, Yu & Bian, 2010). Além do mais, a indução pelo tumor de células T reguladoras (Nomura & Sakaguchi, 2005), o comprometimento das células dendríticas, apresentadoras de antígenos (Pinzon-Charry *et al.*, 2005), a formação de citocinas pelas células tumorais (Lin & Karin, 2007), a ausência de reconhecimento e consequente destruição das células tumorais pelo sistema imunitário, assim

como, anomalias na expressão dos antígenos tumorais levam à tolerância ao tumor (Garrido, Algarra & Garcia-Lora, 2010; Oleinika, Nibbs, Graham & Fraser, 2013; Reinis, 2010).

O progresso das imunoterapias encontra-se portanto dependente destes sistemas de imunossupressão orquestrados pelo tumor. Sendo que apenas vão ser eficazes os protocolos de imunoterapia que conseguirem superar o microambiente imunossupressor criado pelo tumor (Stewart & Smyth, 2011).

Com o avanço das técnicas utilizadas e a constante evolução na área da imunoterapia, tem sido possível avaliar e prever as respostas imunitárias contra tumores, assim como estimar a eficácia clínica e a segurança dos novos tratamentos com imunoterapia. Tendo como objetivo final desenvolver uma forte e duradoura resposta imunitária anti-tumoral, que permita localizar e eliminar as células malignas, não afetando as células de tecidos normais (Guth & Dow, 2013).

Entretanto a utilização de cães como modelos para o estudo do linfoma humano tornou possível a experimentação de novas imunoterapias nestes animais, que no futuro poderão beneficiar tanto os pacientes caninos como os humanos (Khanna, London & Vail, 2009).

Embora existam várias categorias de imunoterapia, os anticorpos monoclonais são atualmente uma das mais eficientes. Sendo que em medicina humana, o uso desta imunoterapia como forma de tratamento do linfoma não-Hodgkin permitiu aumentar o tempo de vida com o mínimo de toxicidade possível (Traullé & Coiffier, 2005), tornando exequível originar uma memória imunológica que consegue evitar recidivas (Zappasodi, de Braud & Di Nicola, 2015). Inclusive segundo Feugier *et al.* (2005), no linfoma difuso de grandes células B o tempo de sobrevivência aumentou 2,7 anos com a combinação do Rituximab ao protocolo CHOP.

Em medicina veterinária ainda é necessário investigar mais nesta área, uma vez que os anticorpos humanos aprovados não reconhecem os antígenos de cão (Impellizeri, Howell, McKeever & Crow, 2006; Jubala *et al.*, 2005). No entanto, em 2011, Stein *et al.*, demonstrou que o anticorpo monoclonal anti-antígeno leucocitário anti-humano (HLA)-DR (L243) produziu uma resposta temporária quando administrado a cães com linfoma, permitindo desta forma continuar a investigação deste anticorpo monoclonal.

Existe também a possibilidade de ligar anticorpos monoclonais a toxinas ou a radioisótopos, para que seja possível eliminar apenas as células que expressem determinados recetores, ou atravessar tumores maciços e destruir o tecido tumoral envolvente (Guth & Dow, 2013).

Além do mais, atualmente já é exequível selecionar as porções variáveis dos anticorpos que correspondem às cadeias pesadas ou leves das imunoglobulinas, de forma a poder utilizá-las no futuro no tratamento de neoplasias como o linfoma canino. Estes fragmentos possuem entre 11 a 15 kDa, consistindo nos mais pequenos fragmentos de anticorpos que se ligam a antígenos (Holt, Herring, Jespers, Woolven & Tomlinson, 2003). Que por serem de tamanho reduzido, conseguem unir-se facilmente aos epítomos pretendidos, ao contrário da IgG e de

outros fragmentos maiores de anticorpos, podendo assim penetrar tumores sólidos de forma mais eficiente (Li & Zhu, 2010). Outras vantagens prendem-se com o facto de apresentarem uma menor imunogenicidade, serem mais estáveis em circulação e permitirem o aumento da potência por dose e uma diminuição do custo de fabrico (Dimitrov & Marks, 2009).

É também importante ter em conta que a forma mais eficaz de controlar o cancro e evitar que as células tumorais se tornem resistentes ao tratamento, é através da combinação da imunoterapia com vários métodos, tais como a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, que por sua vez podem contribuir para a redução do tamanho do tumor e das metástases (Guth & Dow, 2013).

Espera-se que no futuro, a imunoterapia já seja usada frequentemente para tratamento de doenças, como o linfoma canino, tal como já se verifica, atualmente, no tratamento do linfoma não-Hodgkin humano.

### **8.1. CD20**

O CD20 é uma fosfoproteína transmembranar da superfície celular de 35 kDa, que possui dois domínios de sequências de aminoácidos extracelulares, quatro domínios transmembranares e três domínios intracelulares (figura 3) (Bubien, Zhou, Bell, Frizzell & Tedder, 1993; Tedder & Isaacs, 1989).

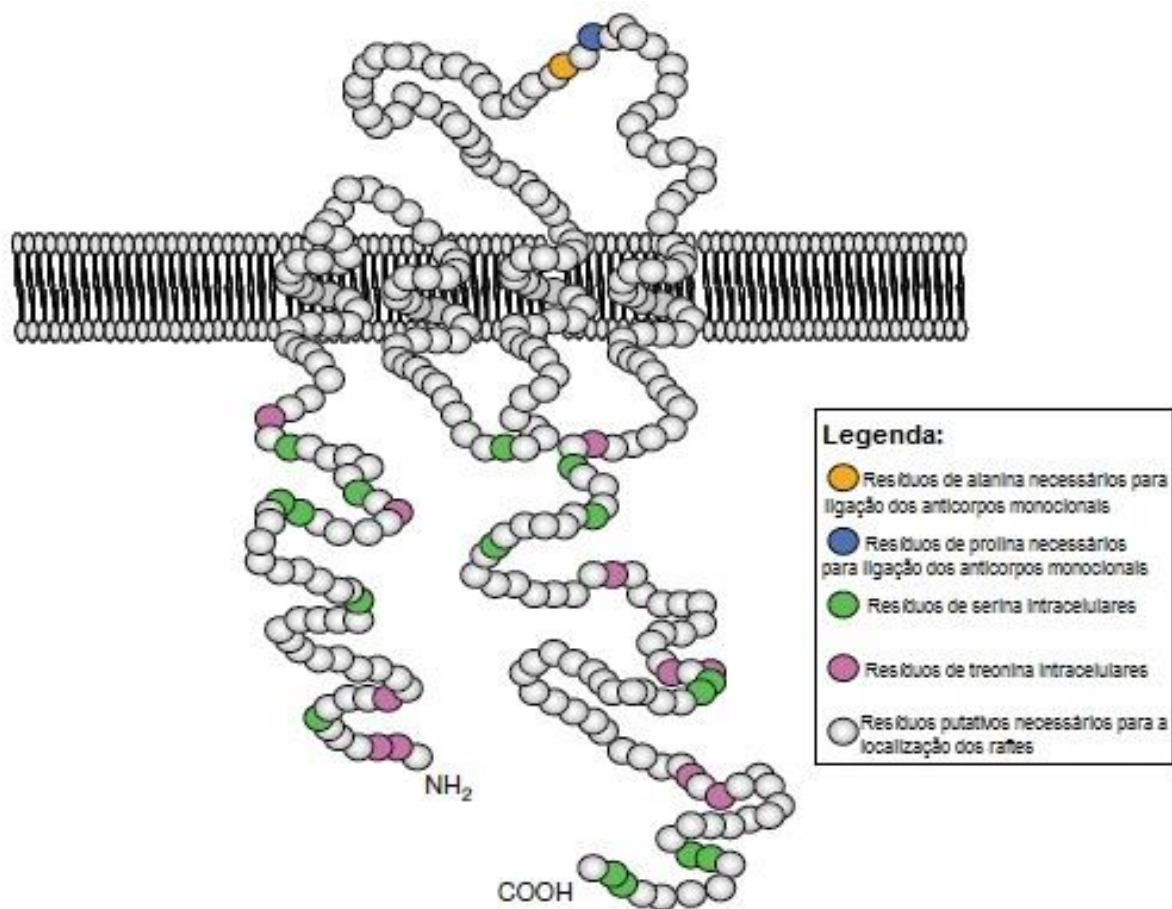
Em humanos e ratos o CD20 é expresso em linfócitos pré-B e em linfócitos B periféricos maduros (Tedder *et al.*, 1988a; Tedder, McIntyre & Schlossman, 1988b; Tedder, Streuli, Schlossman & Saito, 1988c; Uchida *et al.*, 2004; von Schilling, 2003). No entanto, pode existir uma expressão muito diminuída desta proteína em linfócitos T humanos (Hultin *et al.*, 1993). Nas neoplasias malignas de linfócitos B maduros em humanos, geralmente a expressão de CD20 permanece homogeneamente elevada (von Schilling, 2003). Contudo, nalguns casos invulgares de linfomas de células T periféricas e de timomas de células epiteliais malignas foi expresso CD20 (Chilosi *et al.*, 1992; Mohrmann & Arber, 2000).

Relativamente às sequências de aminoácidos entre o CD20 canino e o humano, estas são muito semelhantes (73%), podendo ter ambos a mesma função no sistema imunitário (Kano *et al.*, 2005).

Tendo sido verificado igualmente, que em cães, o CD20 pode ser expresso em células B normais e em linfomas de células B (Kano *et al.*, 2005), o que juntamente com uma baixa taxa de internalização induzida por anticorpos fez do CD20 um alvo atraente para a depleção imunoterapêutica de linfócitos B (Byrd *et al.*, 2002; Grillo-López, 2002; Rassidakis *et al.*, 2002; Tobinai, 2002).

Relativamente à função incerta do CD20, foi observado um aumento do cálcio intracelular em linfócitos B humanos quando os anticorpos se ligavam ao CD20 (Bubien *et al.*, 1993; Shan, Ledbetter & Press, 2000), o que pode indicar que este está envolvido na sinalização do cálcio.

Figura 3: Estrutura molecular do CD20. Adaptado de Cragg, Walshe, Ivanov e Glennie (2005).



### 8.1.1. Anticorpos monoclonais anti-CD20

Em medicina humana, o Rituximab foi o primeiro anticorpo monoclonal anti-CD20 usado no tratamento do linfoma não-Hodgkin indolente ou refratário, tendo sido aprovado em 1997 (Grillo-López, 2002; Plosker & Figgitt, 2003; Tobinai, 2002). Este anticorpo quimérico é constituído por uma região variável de rato e uma região constante de humano (Reff *et al.*, 1994), e pode ser utilizado também no tratamento do linfoma difuso de grandes células B em combinação com quimioterapia, e em doenças imunomediadas (Kazkaz & Isenberg, 2004; Plosker & Figgitt, 2003; von Schilling, 2003).

Embora tenha sido confirmada a expressão do CD20 em linfomas B caninos por imunohistoquímica, através da ligação de um anticorpo aos domínios intracitoplasmáticos do

CD20, nem o Rituximab nem outros 40 anticorpos direcionados contra os domínios extracelulares do humano ou do murganho podem ser usados em imunoterapia de cães, uma vez que não se ligam aos domínios extracelulares do CD20 nativo canino (Impellizeri, Howell, McKeever & Crow, 2006; Jubala *et al.*, 2005).

Entretanto, foi desenvolvido um anticorpo monoclonal denominado 6C8, que se consegue ligar na citometria de fluxo ao domínio extracelular em “loop” do CD20 presente nos linfócitos B caninos. Desta forma, o anticorpo, através da mediação de macrófagos efetores ativados, promove a fagocitose de linfócitos B malignos e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Ito, Brewer, Modiano & Beall, 2015).

Alguns anticorpos monoclonais anti-CD20 humanos detêm ainda a capacidade de induzir toxicidade direta e citotoxicidade dependente de complemento contra linfócitos B tumorais, ao contrário do 6C8 (Teeling *et al.*, 2004).

Com o intuito de obter anticorpos que se possam ligar ao recetor CD20 humano e canino, para que sejam utilizados em estudos comparativos entre cães e humanos, foi concebido o anticorpo monoclonal NCD1.2. A partir deste, foi também criado um anticorpo recombinante scFv<sup>4</sup> monoclonal, que poderá ser utilizado no futuro em imunoterapias anti-CD20 em medicina comparada (Jain *et al.*, 2016).

Foi também produzido outro anticorpo semelhante ao Rituximab mas que podesse ser utilizado como tratamento no linfoma B canino. Tendo sido selecionado o anticorpo monoclonal de murganho 1E4 para a formação de uma molécula quimérica canina que se ligasse ao mesmo sítio no domínio extracelular do CD20. O anticorpo gerado, o 1E4-clgGB, apresentou curvas de depleção de células B muito semelhantes às exibidas pelo Rituximab nos humanos. Contudo, são ainda necessários mais estudos que apoiem a aplicação deste anticorpo em imunoterapia em cães (Rue *et al.*, 2015).

Em 2014, foi apresentado no Encontro da Sociedade Veterinária de Cancro, um estudo piloto em cães sobre a combinação de um anticorpo anti-CD20 com quimioterapia. O tempo médio de sobrevivência sem doença e o tempo de sobrevivência total foi respetivamente 167 e 325 dias, em comparação com os 93,5 dias e 177 dias dos animais que receberam o placebo. Sendo que 26 dos 27 animais que participaram no estudo atingiram uma remissão completa com o tratamento conjunto de quimioterapia com o anticorpo monoclonal (Ogilvie *et al.*, 2015).

Portanto, a criação de mais anticorpos, que se liguem especificamente aos domínios extracelulares do CD20 é extremamente importante para que no futuro se possa utilizar este alvo no tratamento do linfoma canino.

---

<sup>4</sup> Fragmento variável de cadeia simples

## 8.2. CD19

Ultimamente têm sido desenvolvidos mais anticorpos monoclonais que se liguem a outros antígenos, como por exemplo o CD19 humano, uma glicoproteína transmembranar de 95 kDa e 556 aminoácidos, pertencente à superfamília das imunoglobulinas e que se encontra bem conservada entre diferentes espécies (figura 4) (Carter & Barrington, 2004; Tedder, 2009; Wang, Wei & Liu, 2012).

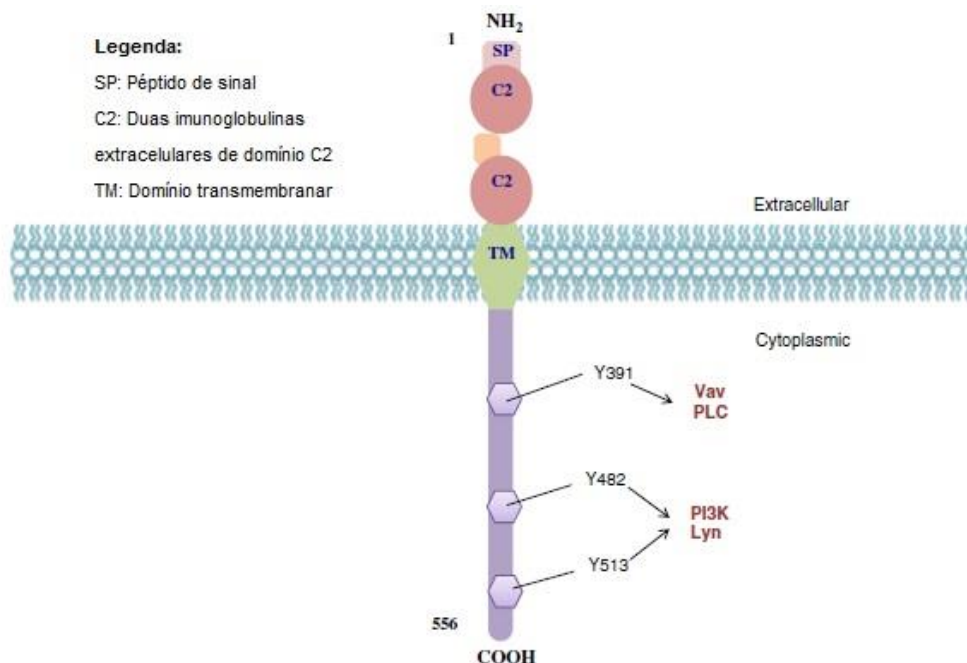
O CD19 é expresso em linfócitos B normais e tumorais, desde as células pré B até à sua diferenciação final em células plasmáticas, assim como em células foliculares dendríticas, sendo portanto um dos biomarcadores de células B mais fiáveis (Bradbury *et al.*, 1992; Haas & Tedder, 2005; Sato *et al.*, 1997; Tedder & Isaacs, 1989; Tedder, 2009). Sendo o gene do CD19, de 7,41 kb, constituído por 15 exões e codificado no braço curto do cromossoma 16, 16p11.2 (Zhou, Ord, Omori & Tedder, 1992).

A função do CD19 é bastante importante na manutenção de uma resposta imunitária eficaz, estando relacionada com o desenvolvimento independente de antígenos, bem como, com a ativação induzida por imunoglobulinas de linfócitos B, criando um complexo com o recetor das células B, de forma, a baixar o seu limiar de ativação (Fujimoto, Poe, Inaoki & Tedder, 1998; Sato, Ono, Steeber, Pisetsky & Tedder, 1996; van Zelm *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 1992).

A maioria dos linfomas de células B possui níveis de expressão de CD19 elevados, uma vez que este raramente desaparece no processo de transformação neoplásica. No entanto, o nível de CD19 pode estar baixo nos linfomas foliculares, tornando possível distinguir este tipo de linfoma de células B de outros (Yang *et al.*, 2005), mas não se encontra em células hematopoiéticas ou noutros tecidos que não sejam derivados de células B (Cooper *et al.*, 2004).



Figura 4: Estrutura molecular do CD19. Adaptado de Wang *et al.* (2012).



### 8.2.1. Anticorpos monoclonais anti-CD19

Como forma de tratamento do linfoma não-Hodgkin humano foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD19, sendo observada uma redução do número de células tumorais (Hekman *et al.*, 1991).

Têm sido desenvolvidos vários anticorpos monoclonais anti-CD19, tais como o SAR3419, um anticorpo IgG1 humanizado, que pode provocar uma morte celular por apoptose (Raufi, Ebrahim & Al-Katib, 2013). Uma vez que não causa uma mielosupressão acentuada consiste numa boa opção para o tratamento de linfoma não-Hodgkin nos humanos combinado com quimioterapia (Al-Katib, Aboukameel, Mohammad, Bissery & Zuany-Amorim, 2009; Blanc *et al.*, 2011).

Enquanto o MOR-208 (XmAb5574) é um anticorpo de murganho humanizado anti-CD19 com um domínio Fc modificado. Sendo eficaz contra vários tipos de linfomas de células B, uma vez que aumenta a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) (Awan *et al.*, 2010; Zalevsky *et al.*, 2009).

Apesar de em medicina humana continuarem a ser produzidos novos anticorpos monoclonais anti-CD19, tais como o anti-B4-bR (Grossbard *et al.*, 1999), o SGN-CD19A (Forero-Torres *et al.*, 2014), o XmAb5871 (Szili *et al.*, 2014), o MDX-1342 (Cardarelli *et al.*, 2010), o GBR 401 (Breton *et al.*, 2014) e o blinatumomab (Portell, Wenzell & Advani, 2013) entre outros, seria de extrema relevância realizar mais investigação em medicina veterinária acerca deste alvo imunoterapêutico.

## **9. Objetivos**

O linfoma de células B, uma neoplasia muito frequente nos cães, cuja forma de tratamento atual, a quimioterapia, permite apenas um tempo médio de sobrevivência de 10 a 14 meses (Garrett, Thamm, Chun, Dudley & Vail, 2002; Modiano *et al.*, 2005) constitui o meu objeto de estudo.

Um tratamento alternativo, a imunoterapia, tem apresentado resultados mais eficazes e com menos efeitos secundários em medicina humana. Assim, a questão principal no meu projeto de investigação foi validar alvos potenciais para imunoterapia do linfoma B canino.

Para o efeito foram escolhidos como recetores a analisar o CD20 e CD19, visto que estes se expressam de forma mais acentuada em células B tumorais, consistindo em bons alvos de diagnóstico e de tratamento nesta patologia (Bradbury, Kansas, Levy, Evans & Tedder, 1992; Byrd *et al.*, 2002; Grillo-López, 2002; Haas & Tedder, 2005; Kano *et al.*, 2005; Rassidakis *et al.*, 2002; Sato, Steeber, Jansen & Tedder, 1997; Tedder & Isaacs, 1989; Tedder, 2009; Tobinai, 2002).

Com este objetivo, foi avaliada, através de Western Blot, a expressão proteica dos recetores CD20 e CD19 de células primárias de linfoma canino. Tendo sido também utilizado um soro policlonal de coelho com a finalidade de avaliar potenciais alvos de imunoterapia, através da técnica de Western Blot.

## **Capítulo IV - Material e Métodos**

### **1. Caracterização das amostras**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Virologia/Imunologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Foram utilizadas amostras de linfonodos de 20 cães com linfoma e de 2 de controlo, sem linfoma.

As amostras de linfonodos dos animais doentes, pertencentes ao biobanco canino, foram recolhidas através de uma biópsia excisional no Hospital Escolar da FMV-ULisboa, onde estes animais foram acompanhados. Tendo sido coletadas antes destes animais terem sido submetidos ao tratamento do linfoma.

Por sua vez, as amostras dos animais que não tinham linfoma, controlo 1 e controlo 2, foram retiradas durante a necrópsia na FMV-ULisboa.

### **1.1. Avaliação clínica dos animais presentes no estudo**

Inicialmente foram efetuados exames clínicos, hemogramas e análises bioquímicas a cada um dos animais incluídos neste estudo.

Os animais com linfoma foram também sujeitos a exames imagiológicos e citologia dos linfonodos periféricos, com o intuito de diagnosticar e estadiar a doença.

### **1.2. Critérios de inclusão**

Os animais de controlo (saudáveis) não podiam apresentar nenhuma doença nem ter recebido um tratamento nas últimas seis semanas antes da colheita das amostras. Além de que as análises hematológicas e bioquímicas teriam que confirmar que estes não se encontravam doentes.

Enquanto para os animais com linfoma se estabeleceu que estes não podiam apresentar outra doença, ou ter sofrido algum tratamento com quimioterapia ou anti-inflamatórios nas últimas quatro semanas. Além disto, os animais escolhidos tinham que ser diagnosticados pela primeira vez com linfoma, através de uma análise histopatológica dos linfonodos recolhidos, que compreendia o exame morfológico, a classificação do índice mitótico e a análise imunohistoquímica com os anticorpos CD3 (DAKO), CD79 $\alpha$ cy (clone HM57, DAKO) e PAX-5 (clone 1EW, Novocastra). Esta análise foi executada no Laboratório de Anatomia Patológica da FMV-ULisboa, e a classificação do linfoma foi realizada de acordo com o sistema da OMS, tendo sido baseada nas análises clínicas e laboratoriais. De seguida, os animais com linfoma iniciaram o tratamento com protocolo CHOP, que dependendo da resposta do animal ao mesmo, ia sendo sucessivamente ajustado.

### **1.3. Critérios de exclusão**

Não foram aceites neste estudo, animais que possuíam outras patologias, como por exemplo, outras neoplasias ou parasitoses, ou que tivessem sido submetidos a um tratamento com anti-neoplásicos ou anti-inflamatórios nas últimas quatro semanas antes de terem sido diagnosticados com linfoma.

## **2. Preparação das amostras**

De forma a isolar as células primárias de linfoma canino a partir das amostras de linfonodos, estes foram macerados, filtrados através de um filtro celular (*Cell Strainer*, BD Falcon®), e colocados no meio RPMI-1640 (Gibco) com 20% FBS (Gibco) para ressuspenderem. As células primárias de linfoma canino foram de seguida suspendidas em FBS (Gibco) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) em alíquotas com  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células, e conservadas em azoto líquido, após a verificação da viabilidade celular com azul de tripano.

As amostras de linfonodo que foram recolhidas de animais de controlo, sem linfoma, foram processadas de forma idêntica às de animais com linfoma.

As linhas celulares utilizadas como controlo foram as CLBL-1 (Barbara Rütgen), células B de linfoma canino, as Raji (ATCC), células de linfoma de Burkitt de humano, e as 293 (ATCC), células de um rim pertencente a um embrião humano. O meio utilizado foi o *Roswell Park Memorial Institute* – 1640 (RPMI-1640) (Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas numa estufa humidificada a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3. Extração da proteína total**

As células foram lisadas com o reagente RIPA (*radio-immunoprecipitation assay*) (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM de NaCl; 1% de NP-40; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS) (Thermo Scientific). Primeiro procedeu-se à lavagem duas vezes em PBS (centrifugação a 400 g, 5 minutos) e descartou-se o sobrenadante. Em segundo lugar, acrescentou-se o reagente RIPA com inibidores de proteases e fosfatases na quantidade de 150 µL. De forma a suspender o *pellet*, pipetou-se a mistura gentilmente e incubou-se em gelo durante 30 minutos. Após 15 minutos voltou-se a pipetar gentilmente a mistura e centrifugou-se a 14000 g durante 10 minutos a 4°C. No fim, efetuou-se transferência do sobrenadante para *eppendorfs* e armazenou-se a -20°C.

Nos testes com o soro policlonal do coelho, as células CLBL-1 foram também lisadas com o *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit* (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante, de modo a obter duas fracções, uma citoplasmática e uma membranar.

### **4. Determinação da concentração de proteína total**

A proteína total foi quantificada com o espectrofotómetro *NanoDrop™ 2000c* (Thermo Scientific) na opção Proteína 280 e através do método de *Bradford* em *Nanodrop* ou em leitor de placas, a uma absorvância a 595 nm.

### **5. Análise das amostras por electroforese**

As amostras de proteína (juntamente com o *loading buffer* e com o SDS) foram incubadas a 100°C durante 10 minutos, de modo a serem reduzidas e desnaturadas. De seguida foram separadas em géis de 11% e 15% de SDS-PAGE (National Diagnostics) a 160 V.

### **6. Coloração dos géis**

Procedeu-se à coloração dos géis de SDS-PAGE com o *Coomassie* para observar o perfil proteico das diferentes células. Primeiro realizou-se a lavagem dos mesmos com água

destilada, depois corou-se com *Coomassie* durante 1h no agitador ou durante a noite a 4°C. Em último lugar, utilizou-se uma solução à base de metanol, ácido acético e água destilada para descorar os géis. A imagem foi obtida no *Chemidoc*™ XRS+ (Bio-Rad). No final os géis foram hidratados com água destilada e armazenados a 4°C.

## 7. Western Blot

Posteriormente, os géis de SDS-PAGE foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (500 mM de glicina, 50 mM Tris-HCl, 0,01% de SDS, 20% de metanol) a 250 mA durante 1h10 usando um *SD Semi-dry Transblot Apparatus* (Bio-Rad). As membranas foram lavadas em PBS-0,2% *Tween* 20 (10 mM de TrisHCl, 100 mM de NaCl, 0,2% de *Tween* a um pH de 7,4) e em seguida foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% em PBS-0,2% *Tween* 20 durante 1 h à temperatura ambiente com agitação ou durante a noite a 4°C, para reduzir as ligações não específicas. Antes de serem expostas ao anticorpo primário, foram lavadas com PBS-0,2% *Tween* 20 três vezes em intervalos de 10 minutos com agitação. Seguindo-se então com a incubação do anticorpo primário em leite em pó desnatado a 1% em PBS-0,2% *Tween* 20 durante 1 h à temperatura ambiente com agitação, sendo novamente lavadas nas mesmas condições três a cinco vezes. De seguida, foram incubadas com anticorpos secundários acoplados a HRP (*horse radish* peroxidase) durante 1 h à temperatura ambiente com agitação. As membranas foram lavadas como anteriormente e as bandas de proteína foram detetadas usando o reagente *Luminata* (substrato quimioluminescente da Amersham biosciences) e visualizadas no *Chemidoc*™ XRS+ (Bio-Rad). A determinação dos tamanhos das proteínas realizou-se através da comparação da migração da banda de proteína com o marcador *NZYS Colour Protein Marker II* (Nzytech).

Os diferentes anticorpos primário e secundário aplicados no Western Blot, tal como a respetiva diluição, estão descritos nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8: Tipos de anticorpos e diluições correspondentes utilizadas.

	CD20	CD19	Soro Policlonal do Coelho
<b>Anticorpo primário</b>	Anti-CD20 <sup>1</sup>	Anti-CD19	Soro Policlonal do Coelho
<b>Diluição</b>	1/500	1/1000	1/500 e 1/1000
<b>Anticorpo secundário</b>	Anti-rabbit <sup>2</sup>	Anti-goat	Anti-rabbit <sup>2</sup>
<b>Diluição</b>	1/10 000	1/10 000	1/10 000

<sup>1</sup>(Thermo Fisher Scientific)

<sup>2</sup>(Jackson ImmunoResearch)

Tabela 9: Anticorpos e diluições correspondentes utilizadas para calibrar os resultados do Western Blot.

<b>B-actina</b>	
<b>Anticorpo primário</b>	Anti- $\beta$ -actina <sup>1</sup>
<b>Diluição</b>	1/10 000
<b>Anticorpo secundário</b>	Anti-mouse
<b>Diluição</b>	1/5000

<sup>1</sup>(Sigma)

## Capítulo V - Resultados e Discussão

### 1. Otimização da técnica

Inicialmente foi necessário testar os anticorpos primários anti-CD20 e anti-CD19 e os anticorpos secundários, para que fosse possível averiguar se a metodologia previamente definida permitia obter os resultados que se pretendiam.

Para tal, utilizou-se como controlos as linhas celulares CLBL-1, Raji e 293 de modo a avaliar a expressão dos dois recetores no produto final (proteína) destas células.

Tendo em conta que as CLBL-1 consistem em células B de linfoma canino e que as Raji correspondem a células de linfoma de Burkitt de humano, seria esperado que ambas expressassem CD20 e CD19, constituindo desta forma os controlos positivos do estudo.

As 293, por outro lado, representam o controlo negativo do estudo, uma vez que consistem em células de um rim pertencente a um embrião humano, logo não expressam CD20 nem CD19.

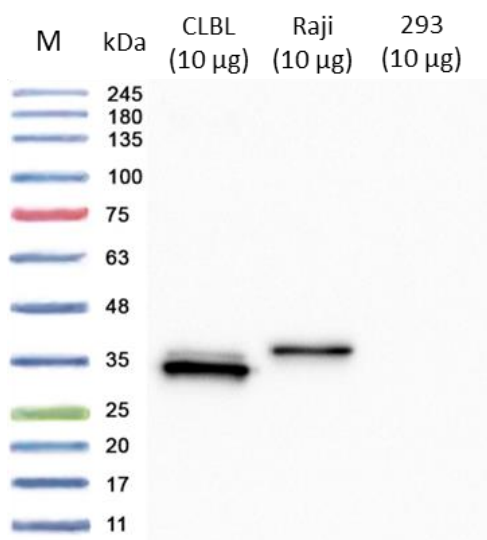
Tendo sido utilizada a técnica de Western Blot de modo a detetar a proteína do CD20 e do CD19 presente no extrato proteico total.

#### 1.1. Teste do CD20

Em primeiro lugar, foi avaliada a expressão de CD20 no produto final (proteína) das células CLBL-1, Raji e 293.

Os resultados obtidos por Western Blot demonstrados na figura 5 confirmam a presença de uma banda compatível com 35 kDa, em ambas as células CLBL-1 e Raji.

Figura 5: Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, Raji e 293, de forma a identificar a presença do recetor CD20.



**Legenda:** Marcador NZYColour Protein Marker II (Nzytech) identificado como M.

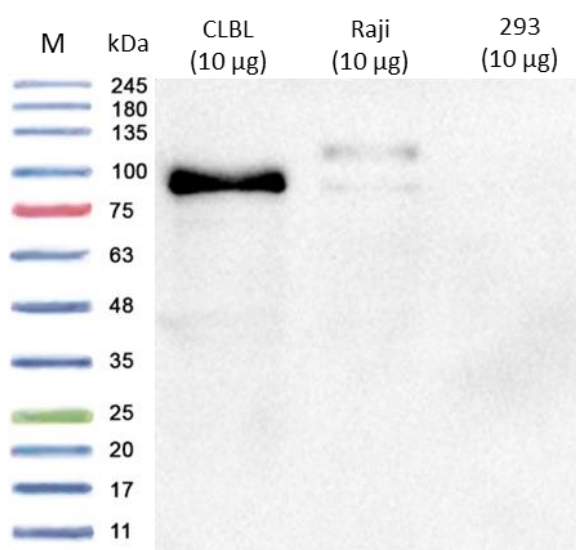
Uma vez que a proteína do CD20 possui uma massa molecular de aproximadamente 35 kDa, é possível concluir que tanto as CLBL-1, como as Raji, expressam CD20. Enquanto as 293, como estava previsto, não expressam CD20.

## 1.2. Teste do CD19

Do mesmo modo, foi avaliada ainda a expressão de CD19 no produto final (proteína) das células CLBL-1, Raji e 293 através do Western Blot.

Os resultados do Western Blot apresentados na figura 6 evidenciam duas bandas compatíveis com 100 kDa, uma nas células CLBL-1 e outra nas Raji.

Figura 6: Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, Raji e 293, de forma a identificar a presença do recetor CD19.



**Legenda:** Marcador NZYColour Protein Marker II (Nzytech) identificado como M.

A proteína do CD19 possui uma massa molecular de aproximadamente 100 kDa, assim como as bandas evidenciadas no Western Blot (Figura 6), portanto comprovou-se que as células CLBL-1 e Raji expressam CD19, ao contrário das células 293, que permanecem como controlo negativo do estudo.

Por conseguinte, estes resultados permitiram confirmar que as variáveis utilizadas, como o tipo de anticorpo, diluição, número de lavagens, entre outras, seriam as mais indicadas para o estudo a realizar posteriormente com os casos clínicos.



## 2. Casos clínicos

Após a otimização da técnica procedeu-se então à avaliação do CD20 e do CD19 nos casos clínicos do biobanco, constituído por amostras de linfonodos de 20 cães com linfoma e de 2 de controlo (C1 e C2), sem linfoma, recolhidos através de uma biópsia excisional.

A média de idade dos animais diagnosticados com esta patologia é de 9 anos, sendo 65% dos animais doentes do sexo masculino e 35% do sexo feminino (tabela 10).

Tabela 10: Dados clínicos dos 20 casos de linfoma.

Nome	Caso	Data de nascimento	Idade	Raça	Sexo
Polly	A1	01-01-2000	12	Schnauzer	Macho
Junior	A2	01-01-1998	15	Indeterminada	Macho
Edwin	A3	01-01-2006	8	Labrador	Macho
Tobias	A4T1	01-01-2002	12	Labrador	Macho
Caco	B1	20-10-2006	6	Rottweiler	Macho
Jaya	B2T1	09-06-2007	6	Basset Hound	Fêmea
Scar	B3T1	02-09-2001	12	Pit Bull	Fêmea
Mogli	B5T1	24-12-2005	8	Indeterminada	Macho
Bambi	B6	01-08-2002	11	Indeterminada	Fêmea
Bolota	B7	07-10-2004	9	Boxer	Fêmea
Deep	B8T1	20-12-2006	7	xPointer	Macho
Tucha	B9T1	09-07-1997	17	Indeterminada	Fêmea
Janne	B10T1	19-04-2011	3	Pastor Alemão	Fêmea
Bernardo	B11	01-01-2007	8	Indeterminada	Macho
Ernesto	B13T1	23-12-2006	9	Indeterminada	Macho
Quico	B14T1	10-04-2011	4	Golden Retriever	Macho
Sheik	B15	25-08-2007	8	Beagle	Macho
Murphy	B16	23-11-2010	5	Retriever do Labrador	Macho
Swami	B18	29-09-2004	11	Doberman	Fêmea
Igor	B19	01-01-2007	9	Galgo Afegão	Macho

Segundo a análise imunohistoquímica, 80% dos casos clínicos de linfoma foram classificados como linfoma de células B, 15% como linfoma de células T, e 5% como linfoma de células não B nem T, como ilustrado na tabela 11.

Relativamente ao estágio da doença, 35% dos animais com linfoma encontravam-se no estágio mais avançado da doença, 60% no quarto estágio, e apenas 5% no segundo estágio (tabela 11).

Tabela 11: Dados resultantes da análise imunohistoquímica e o estágio da doença dos 20 animais com linfoma.

Nome	Caso	Imunohistoquímica	Estádio
<b>Polly</b>	A1	Linfoma de células B	Vb
<b>Junior</b>	A2	Linfoma de células T	Vb
<b>Edwin</b>	A3	Linfoma de células B	Vb
<b>Tobias</b>	A4T1	Não é linfoma de células B nem T	Vb
<b>Caco</b>	B1	Linfoma de células B	IVb
<b>Jaya</b>	B2T1	Linfoma de células B	IVb
<b>Scar</b>	B3T1	Linfoma de células B	Vb
<b>Mogli</b>	B5T1	Linfoma de células B	IVb
<b>Bambi</b>	B6	Linfoma de células B	Ila
<b>Bolota</b>	B7	Linfoma de células B	Vb
<b>Deep</b>	B8T1	Linfoma de células B	IVa
<b>Tucha</b>	B9T1	Linfoma de células B	IVb
<b>Janne</b>	B10T1	Linfoma de células B	IVb
<b>Bernardo</b>	B11	Linfoma de células B	IVb
<b>Ernesto</b>	B13T1	Linfoma de células T	IVb
<b>Quico</b>	B14T1	Linfoma de células B	IVb
<b>Sheik</b>	B15	Linfoma de células T	IVb
<b>Murphy</b>	B16	Linfoma de células B	IVb
<b>Swami</b>	B18	Linfoma de células B	Vb
<b>Igor</b>	B19	Linfoma de células B	IVb

### 2.1. Quantificação da proteína total

A partir das amostras de linfonodos dos animais que fizeram parte do estudo, foram isoladas células primárias de linfoma canino, tendo sido conservadas em azoto líquido entre  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células por caso (tabela 12).

Após o processo de extração da proteína total das células com o reagente RIPA foi necessário determinar a concentração do extrato proteico total dos casos clínicos, dos controlos e das linhas celulares (CLBL-1, Raji e 293), para que fosse colocado em cada um dos poços do gel de SDS-PAGE a mesma quantidade de proteína total (tabela 12).

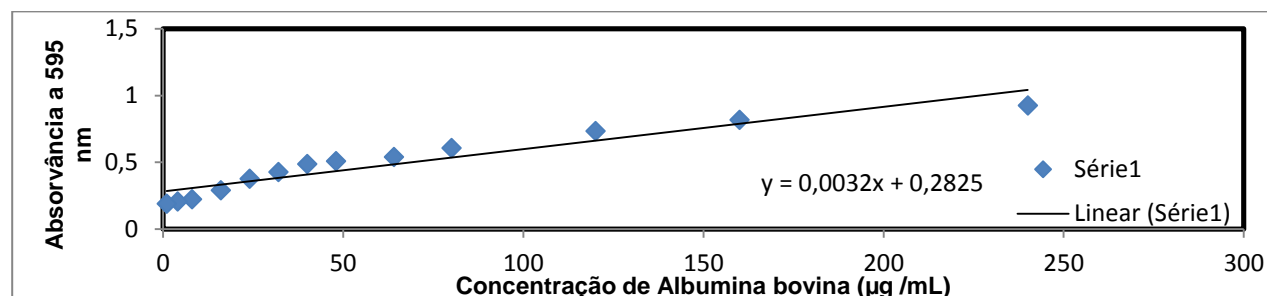
Uma vez que a quantificação efetuada através do método de *Bradford* em *Nanodrop™ 2000c* (Thermo Scientific) não apresentava muito rigor, foi necessário recorrer ao método de *Bradford* num leitor de placas.

Além do mais, a quantidade de amostra em cada poço foi aumentada de 10 µg para 15 µg de forma a ampliar o sinal.

Este método permite a determinação de proteínas totais, usando o corante “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. Tendo sido elaborada uma curva de calibração que correlaciona a absorvância a

595 nm com a concentração de albumina bovina sérica, e que é depois aplicada na estimativa da concentração proteica (figura 7).

Figura 7: Curva de *Bradford* utilizada na quantificação da proteína total.



Na tabela 12 constam os valores de concentração do extrato proteico obtidos na quantificação, bem como o volume de amostra aplicado em cada um dos poços do gel de SDS-PAGE.

Tabela 12: Quantificação da proteína total das CLBL-1, Raji, 293 e das células dos casos clínicos.

Nome	Caso	Células <sup>1</sup>	Concentração do extrato (µg/µl)	Volume utilizado <sup>2</sup> (µl)
Polly	A1	1x10 <sup>7</sup>	1	15
Junior	A2	1x10 <sup>7</sup>	1,6	9,6
Edwin	A3	1x10 <sup>7</sup>	1,5	10
Tobias	A4T1	1x10 <sup>7</sup>	2,2	6,9
Caco	B1	1x10 <sup>7</sup>	2,2	6,9
Jaya	B2T1	1x10 <sup>7</sup>	2,3	6,5
Scar	B3T1	1x10 <sup>7</sup>	1,5	9,7
Mogli	B5T1	1x10 <sup>7</sup>	3,1	4,9
Bambi	B6	1x10 <sup>7</sup>	3	5
Bolota	B7	1x10 <sup>7</sup>	1,5	9,7
Deep	B8T1	1x10 <sup>7</sup>	3,5	4,3
Tucha	B9T1	1x10 <sup>7</sup>	1,9	8,1
Janne	B10T1	1x10 <sup>7</sup>	1,2	12,2
Bernardo	B11	1x10 <sup>7</sup>	3,1	4,8
Ernesto	B13T1	1x10 <sup>7</sup>	2,1	7,3
Quico	B14T1	1x10 <sup>7</sup>	1,3	11,8
Sheik	B15	5x10 <sup>6</sup>	1,8	8,5
Murphy	B16	5x10 <sup>6</sup>	1,5	10,2
Swami	B18	1x10 <sup>7</sup>	3,3	4,6
Igor	B19	1x10 <sup>7</sup>	2,8	5,3
C1	Linfonodo	1x10 <sup>7</sup>	1,6	9,1
C2	Linfonodo	1x10 <sup>7</sup>	1,9	7,9
CLBL-1			4,4	3,4
Raji			6,1	2,5
293			5,2	2,9

<sup>1</sup>(número de células presentes em cada uma das alíquotas)

<sup>2</sup>(para obter 15 µg de amostra em cada poço)

### **3. Avaliação da expressão do CD20**

Dado que o teste do CD20 nas linhas celulares durante a otimização da técnica obteve os resultados pretendidos, foi possível analisar então a expressão de CD20 no produto final (proteína) das amostras dos casos clínicos, assim como dos controlos e das linhas celulares, tendo sido utilizada a técnica de Western Blot.

Todavia, foi necessária uma otimização da quantificação da proteína, de forma a conseguir validar os resultados adquiridos.

À semelhança dos resultados anteriores, o Western Blot evidencia uma elevada expressão de CD20 em células primárias de linfoma B do biobanco canino e em CLBL-1, ao apresentar bandas de 35 kDa bem evidentes em todos estes casos (figura 8).

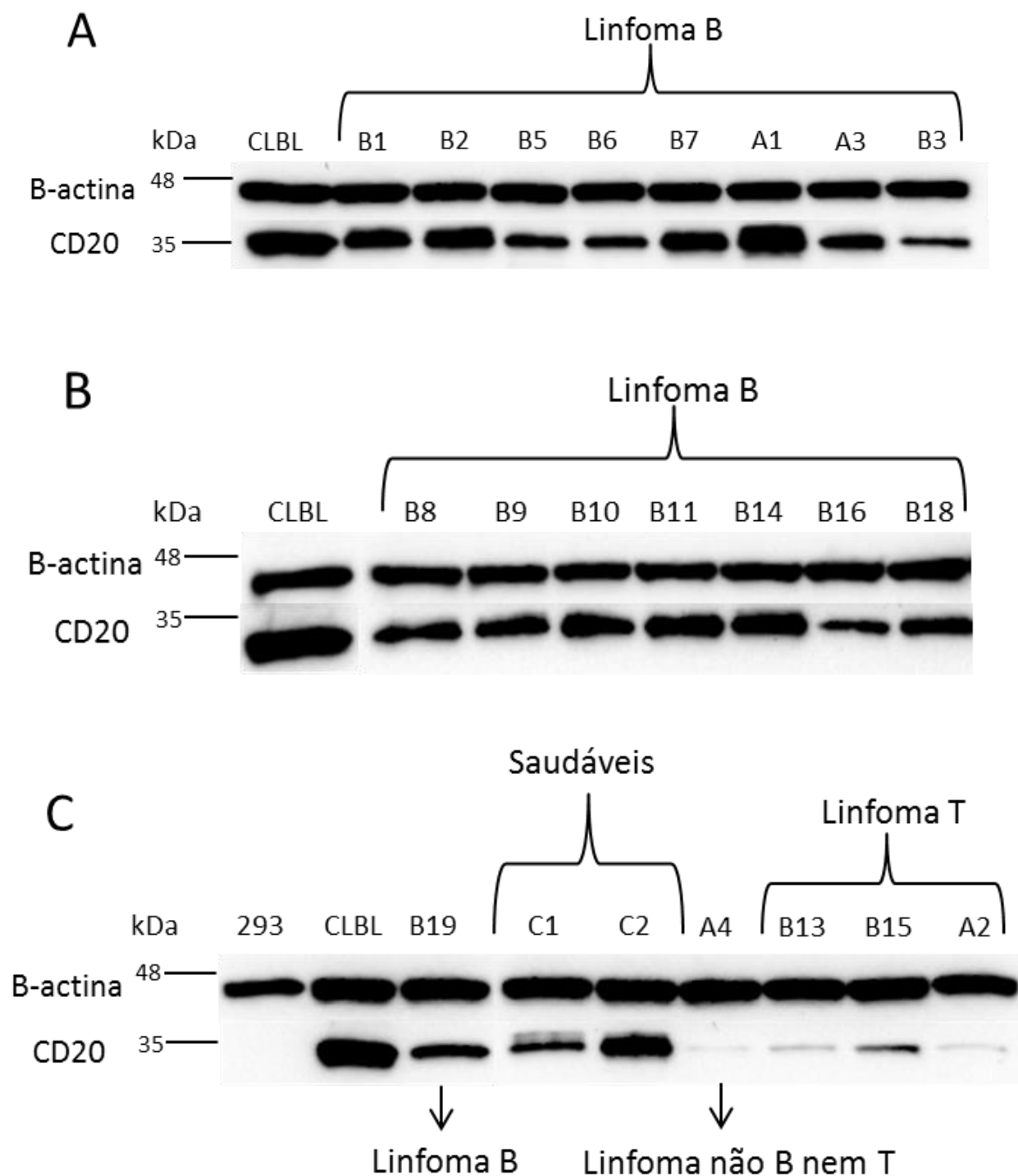
Também como esperado, a linha celular 293 e os casos de linfoma T e não B nem T praticamente não expressaram CD20 (figura 8C).

No entanto, os controlos 1 e 2 (C1 e C2) expressaram CD20 (figura 8C), o que pode sugerir que estes animais não se encontravam totalmente saudáveis. Contudo, as amostras de linfonodos de animais saudáveis, e dos linfomas T e não B nem T também podem conter linfócitos B normais, porém a um nível menos significativo.

Uma repetição do estudo com outras amostras de linfonodos de animais saudáveis, que sejam sujeitos a múltiplos exames de diagnóstico para despiste de patologias, seria proveitosa do ponto de vista experimental, tendo sido posteriormente utilizadas amostras de linfonodos de animais de um biotério de experimentação animal na tese de mestrado da Mariana Lopes e André Almeida.

Realça-se ainda que foi possível proceder à validação dos resultados obtidos com a  $\beta$ -actina, como constatado pela presença de bandas de 48 kDa semelhantes em cada um dos casos (figura 8).

Figura 8: Western Blot do extrato proteico total das células primárias de linfoma canino do biobanco, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, de forma a identificar a presença do recetor CD20.



#### 4. Avaliação da expressão do CD19

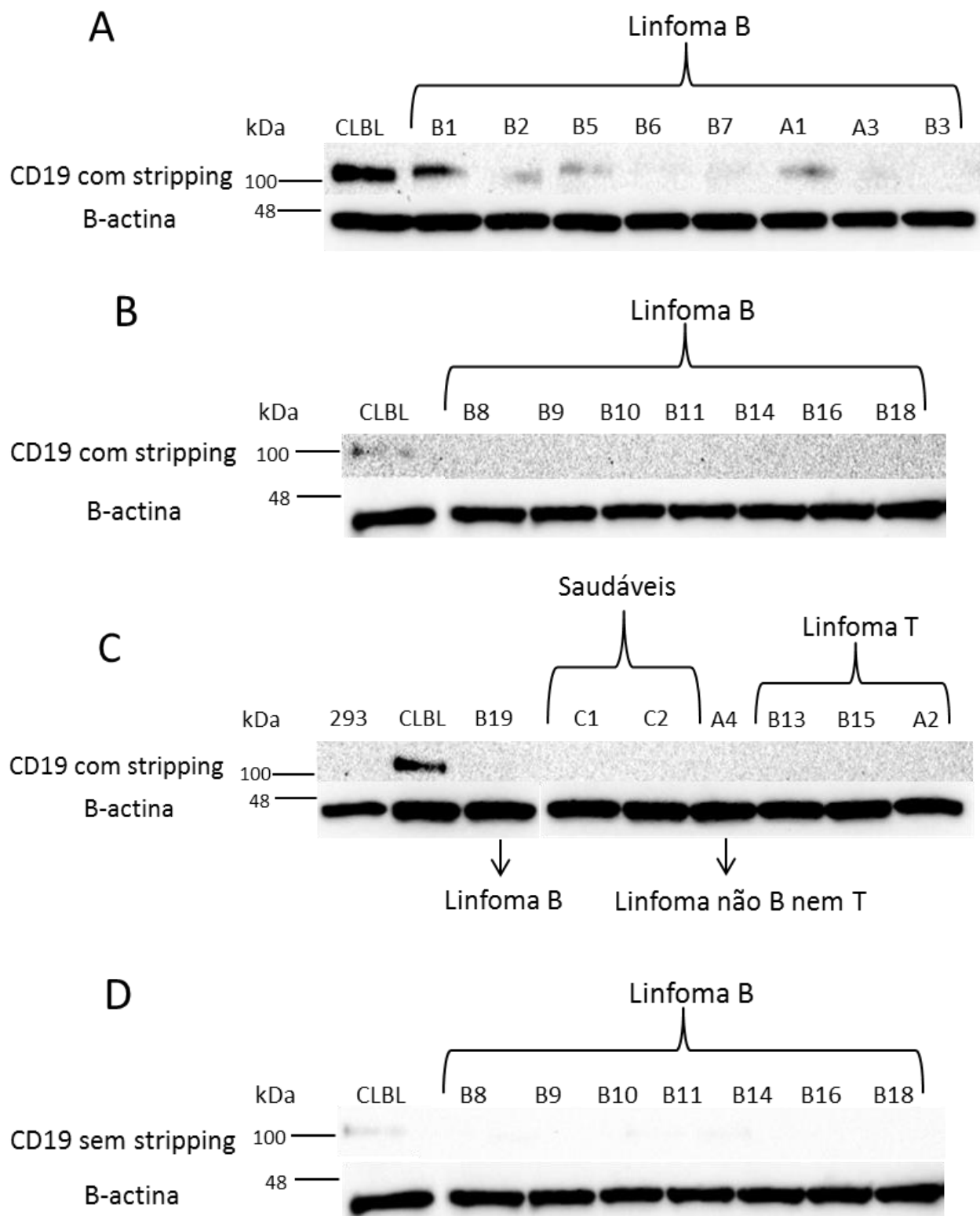
De seguida, foram retirados os anticorpos primário e secundário (*stripping*) das últimas membranas obtidas através de Western Blot, para proceder com a avaliação da expressão de CD19 no produto final (proteína) das células primárias de linfoma do biobanco canino. Dado que as concentrações de proteína determinadas na quantificação já tinham sido otimizadas e o anticorpo CD19 já tinha sido testado com sucesso nas linhas celulares no início do estudo.

Os resultados apresentados na figura 9, não permitem tirar conclusões sobre a expressão do CD19 nas células dos casos clínicos, devido à inexistência da maior parte das bandas de 100 kDa, que seria a massa molecular aproximada deste recetor.

Após a obtenção destes resultados foi realizado um Western Blot, sem recorrer ao *stripping* de membranas, mas utilizando a mesma quantidade de proteína, onde se verifica também a ausência de bandas nítidas (figura 9D).

Contudo, o anticorpo anti-CD19 selecionado reconhece as CLBL-1, que constitui uma linha estável, ao contrário das células dos casos clínicos. Uma vez que na linha estável o CD19 está provavelmente a ser mais expresso, sendo mais fácil de detetar com a diluição do anticorpo utilizada. Portanto, uma possível causa para o sucedido poderia estar relacionada com o anticorpo anti-CD19, tornando-se necessário no futuro procurar outros anticorpos que reconheçam o recetor CD19 canino nas amostras dos casos clínicos, e repetir novamente a experiência. Além disso, também seria importante otimizar a diluição futuramente para tentar detetar expressões mais baixas de CD19.

Figura 9: Western Blot do extrato proteico total das células primárias de linfoma canino do biobanco, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, de forma a identificar a presença do recetor CD19.



## 5. Soro policlonal do coelho

Os anticorpos policlonais de coelho têm sido utilizados nas últimas décadas como fontes de anticorpos com várias aplicações a nível diagnóstico. Além disso, na última década, anticorpos de domínio único (sdAbs) derivados de coelho demonstraram também potencialidades a nível terapêutico (Aires *et al.*, 2014; Rader *et al.*, 2000).

Ademais, a produção de soro policlonal de coelho que contenha anticorpos que reconhecem determinados antigénios tem sido de grande utilidade, permitindo de seguida a identificação das proteínas reconhecidas através da técnica de Western Blot (Surman *et al.*, 1998).

Portanto, com o objetivo de identificar e analisar outros recetores que estejam presentes no biobanco canino, e que possam ser utilizados no futuro como potenciais alvos no tratamento do linfoma B, foi utilizado um soro policlonal produzido através da imunização de coelhos com células do biobanco, nomeadamente B1 e B2.

### 5.1. Teste do soro policlonal do coelho

Primeiro o soro policlonal do coelho foi testado com a linha celular CLBL-1, de modo a otimizar as diluições e o número de lavagens necessárias para que fosse possível obter os resultados desejados.

Assim sendo, a técnica de Western Blot foi aplicada para analisar o perfil proteico das células CLBL-1 detetado pelos anticorpos existentes no soro policlonal dos coelhos imunizados com células do biobanco.

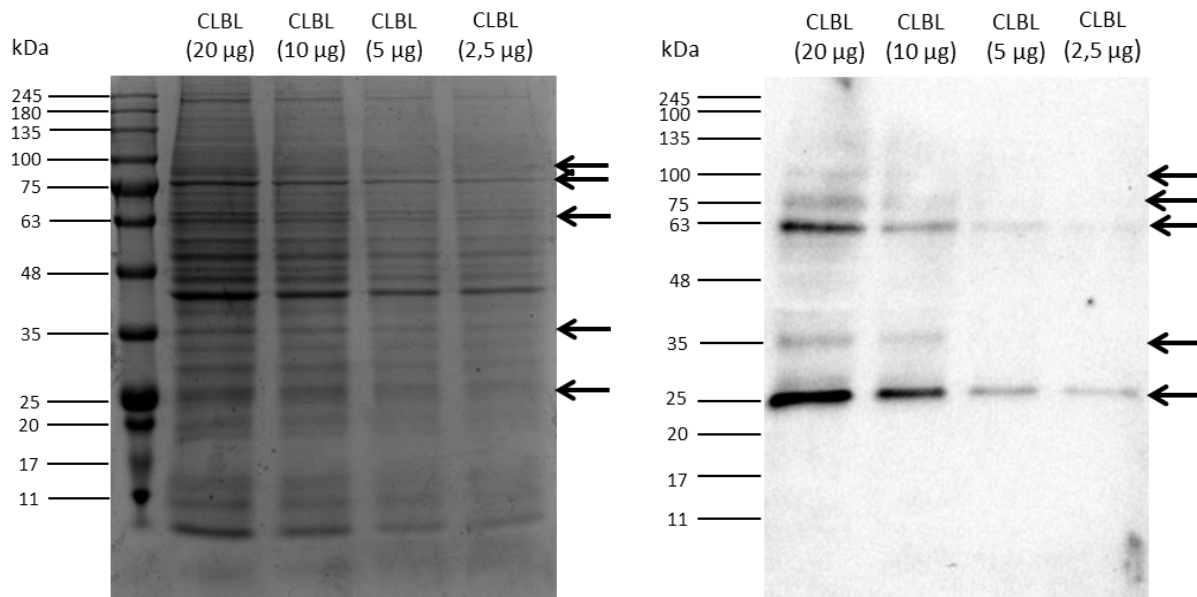
O gel de SDS-PAGE obtido após a eletroforese em gel de poliacrilamida foi corado com o *Coomassie*, que se liga às proteínas das células e adquire uma cor mais intensa conforme a quantidade de proteínas presente.

Deste modo, a coloração de metade do gel com o *Coomassie*, permitiu observar o perfil proteico das CLBL-1, tendo sido utilizadas concentrações decrescentes do extrato proteico destas células, como demonstrado na figura 10.

Por sua vez, os resultados do Western Blot expostos na figura 10, revelam a existência de várias bandas, sendo que as mais evidentes se encontram na ordem dos 25, 35, 63, 75 e 100 kDa. Estas bandas podem corresponder a outros recetores para além do CD20 e CD19, que foram reconhecidos pelo soro policlonal do coelho no extrato proteico das células CLBL-1.



Figura 10: Gel do extrato proteico total das células CLBL-1 em concentrações decrescentes de 20, 10, 5 e 2,5 µg corado com o *Coomassie*, à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das células CLBL-1, à direita.



**Legenda:** As setas correspondem às bandas na ordem dos 25, 35, 63, 75 e 100 kDa identificadas no Western Blot.

## 5.2. Extração das CLBL-1 com o reagente *Mem-PER™ Plus Membrane*

Tendo em conta, que os recetores das células podem estar localizados na membrana plasmática ou intracelularmente (recetores citoplasmáticos), e consequentemente podem atuar de forma diferente e apresentar funções distintas, torna-se pertinente o estudo diferenciado destes dois tipos de recetores. Sendo o objetivo final obter potenciais recetores que se encontrem na membrana e não intracelularmente.

Assim, de forma a obter duas frações, uma citoplasmática e uma membranar, as células CLBL-1 foram lisadas com o *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit* (Thermo Scientific), permitindo a observação do perfil proteico de cada uma das frações separadamente após a realização do Western Blot.

Na figura 11, correspondente ao gel de SDS-PAGE obtido por eletroforese e corado com o *Coomassie*, é possível verificar as diferenças entre a primeira fração, correspondente à citoplasmática, e a segunda fração, a membranar, sendo que a citoplasmática possui bandas mais evidentes relativamente à membranar.

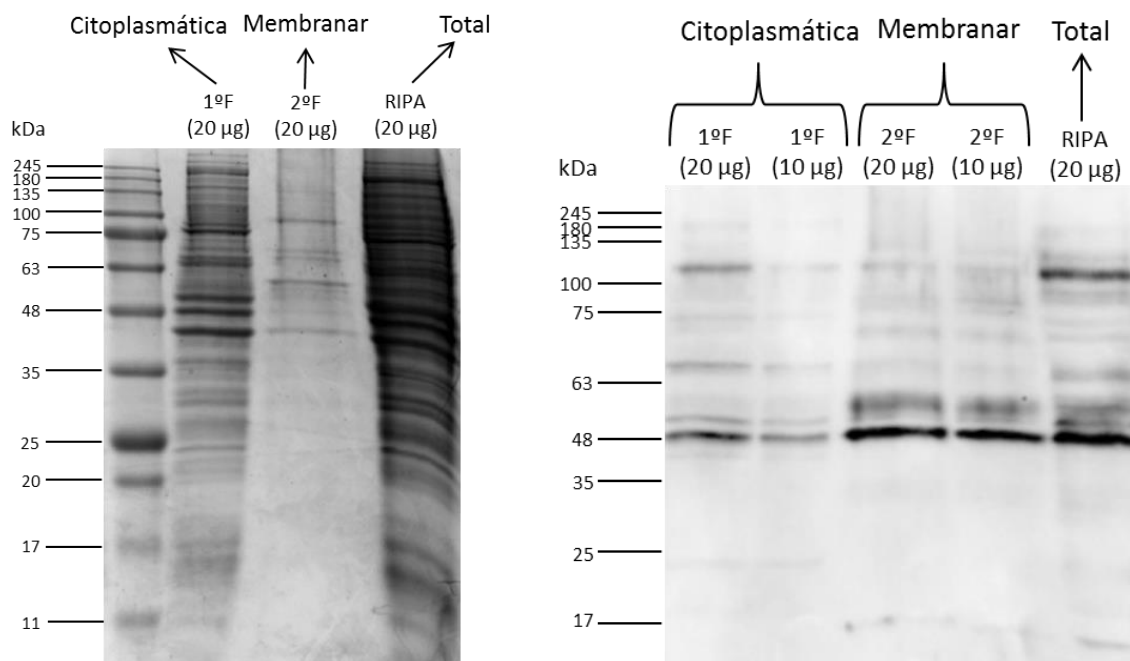
O perfil proteico total das CLBL-1 que foram lisadas com o reagente RIPA também se encontra representado na figura 11.

Segundo o Western Blot evidenciado na figura 11, as bandas correspondentes à fração membranar são mais notórias e em maior quantidade, em comparação com as da fração

citoplasmática. Portanto, é possível constatar que um maior número de recetores membranares foi reconhecido pelo soro policlonal do coelho nas células CLBL-1.

Além disso, a especificidade desta técnica é maior, dado que foi possível o isolamento das proteínas membranares.

Figura 11: Gel do extrato proteico da 1º fração, 2º fração e total (RIPA) das células CLBL-1, corado com o *Coomassie*, à esquerda. Western Blot do extrato proteico da 1º fração, 2º fração e total (RIPA) das células CLBL-1, à direita.



### 5.3. Detecção com o soro policlonal do coelho de potenciais alvos para imunoterapia

Por último, foi realizada a avaliação de potenciais alvos para imunoterapia através da técnica de Western Blot, e deteção com o soro policlonal do coelho. De forma a identificar e analisar outros recetores que estejam presentes no biobanco canino, e que possam ser utilizados no futuro no tratamento do linfoma B.

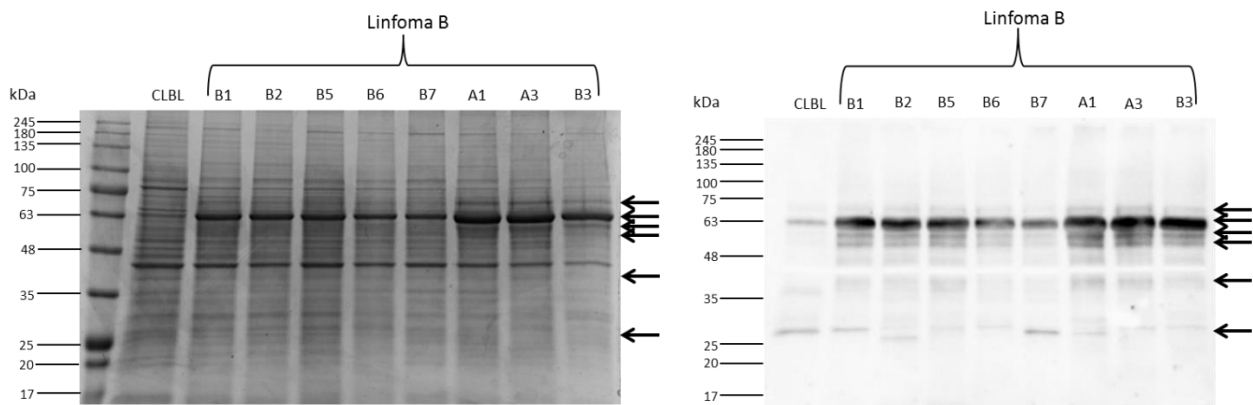
Uma vez que o soro policlonal de coelho já tinha sido testado no início do estudo com a linha celular CLBL-1, procedeu-se então à análise do perfil proteico das células primárias de linfoma dos casos clínicos. Deste modo, através de Western Blot, as proteínas destas células foram reconhecidas pelos anticorpos existentes no soro policlonal dos coelhos imunizados com células do biobanco, nomeadamente B1 e B2.

Cada um dos géis de SDS-PAGE obtidos após a eletroforese em gel de poliacrilamida foram corados com o *Coomassie*, de modo a revelar o perfil proteico das linhas celulares, das amostras dos casos clínicos e dos controlos 1 e 2 (C1 e C2) (figuras 12, 13 e 14).

No que diz respeito aos resultados do Western Blot exibidos nas figuras 12, 13 e 14, consegue-se examinar múltiplas bandas entre os 75 e 25 kDa, identificadas também no gel de SDS-PAGE corado com *Coomassie*.

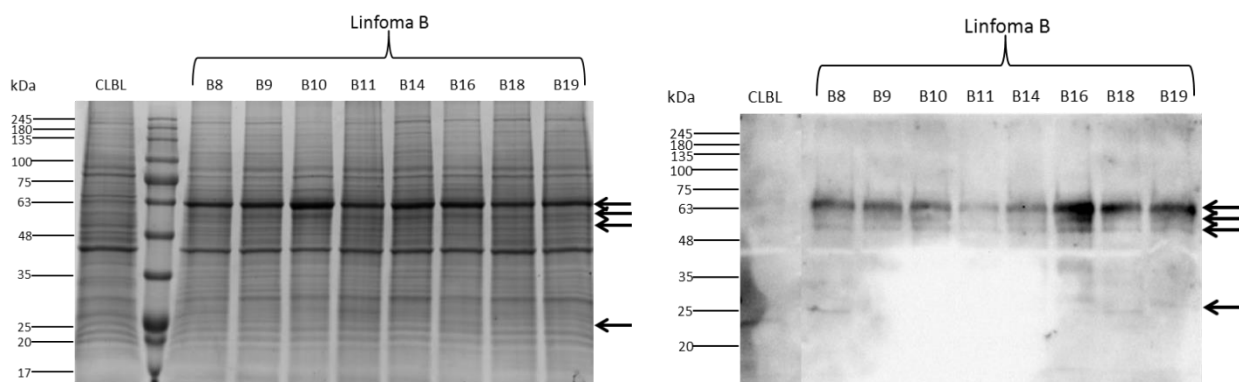
Desta forma, é possível concluir que o soro policlonal do coelho reconheceu proteínas no extrato proteico das células dos casos clínicos que podem representar outros recetores além do CD20 e CD19. Para identificar e caracterizar melhor estes potenciais recetores vários estudos estão a decorrer.

Figura 12: Gel do extrato proteico total de algumas das células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, corado com o *Coomassie*, à esquerda. Western Blot do extrato proteico total de algumas das células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, com o soro policlonal do coelho, à direita.



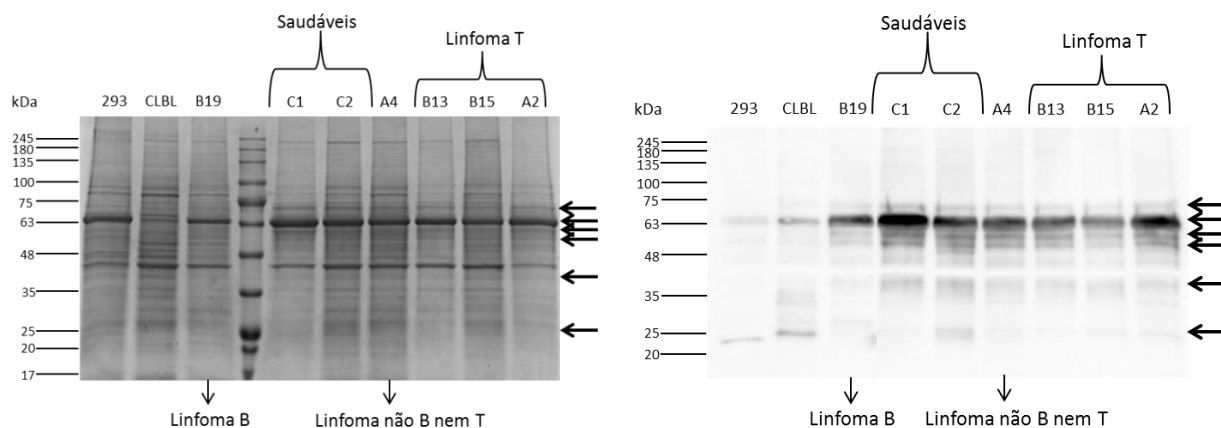
**Legenda:** As setas correspondem às bandas entre os 25 e 75 kDa identificadas no Western Blot.

Figura 13: Gel do extrato proteico total das restantes células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, corado com o *Coomassie* à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das restantes células primárias de linfoma B canino do biobanco e das CLBL-1, com o soro policlonal do coelho, à direita.



**Legenda:** As setas correspondem às bandas na ordem dos 25, e dos 48 aos 63 kDa identificadas no Western Blot.

Figura 14: Gel do extrato proteico total das células de linfoma T, linfoma não B nem T, linfoma B, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, corado com o *Coomassie*, à esquerda. Western Blot do extrato proteico total das células de linfoma T, linfoma não B nem T, linfoma B, das amostras dos controlos 1 e 2 (C1 e C2), e das linhas celulares, com o soro policlonal do coelho, à direita.



**Legenda:** As setas correspondem às bandas entre os 25 e 75 kDa identificadas no Western Blot.

## Capítulo VI - Conclusão e Perspetivas Futuras

Atualmente utiliza-se quimioterapia como forma de tratamento do linfoma B canino, mas a resistência aos fármacos anti-neoplásicos e a toxicidade inerente aos quimioterápicos, evidencia a necessidade de investigação de outras formas de tratamento, como a imunoterapia (Lage, 2008).

Em medicina humana, o CD20 é considerado um alvo terapêutico de grande importância no tratamento do linfoma de células B, revelando-se igualmente essencial o estudo deste recetor nos cães (Ito *et al.*, 2015; Plosker & Figgitt, 2003).

O CD19 também se utiliza como alvo no tratamento do linfoma não-Hodgkin humano, embora não tenha a mesma relevância que o CD20 (Hekman *et al.*, 1991).

De forma, a avaliar a expressão destes dois recetores, o CD20 e o CD19, em células primárias de linfoma, e constatar se consistem em bons alvos de diagnóstico e de tratamento do linfoma B canino, foram analisadas amostras de linfonodos de 20 animais doentes e de 2 de controlo, sem linfoma.

No final, os resultados obtidos por Western Blot permitiram validar o CD20 como alvo potencial para imunoterapia, pela elevada expressão deste recetor em células primárias de linfoma B do biobanco canino e em CLBL-1. Os resultados conseguidos estavam em concordância com o referido anteriormente por Kano *et al.* (2005) uma vez que através da análise de RT-PCR, se identificou a presença de mRNA do CD20 canino em amostras de linfonodos e de PBMCs de animais com linfoma de células B, mas não em linfomas de células T, nem em linfomas nem B nem T. O estudo realizado por Jubala *et al.* (2005), também confirma os resultados obtidos, visto que o anticorpo policlonal de coelho utilizado, o LV-anti-CD20, se ligou a linfócitos B mas não a linfócitos T de cães com linfoma, tendo igualmente reconhecido proteínas na ordem dos 32 aos 36 kDa. Além disso, também o anticorpo 6C8 detetou uma proteína de 35 kDa, que corresponde ao recetor CD20, em células primárias de linfoma B canino através de Western Blot (Ito *et al.*, 2015), à semelhança dos resultados adquiridos neste estudo.

Dado que no linfoma não-Hodgkin humano, a expressão de CD20 também permanece homogeneamente elevada (von Schilling, 2003), podemos inferir que o cão no que respeita ao linfoma B é um bom modelo para o homem.

A quantificação dos níveis de mRNA de CD20 por qRT-PCR que seria relevante para confirmar e correlacionar com os resultados de expressão proteica de CD20 obtidos foi realizada no seguimento deste estudo, sendo os resultados apresentados na tese de mestrado do André Almeida.

Relativamente ao CD19, os resultados de Western Blot não permitiram concluir sobre a expressão deste recetor nas células dos casos clínicos. Assim sendo, futuramente devem ser

efetuadas mais experiências com outros anticorpos anti-CD19 que apresentem uma maior especificidade para o recetor no cão, de modo a que seja possível avaliar melhor a expressão desta proteína em situações de linfoma canino.

Por último, foi utilizado o soro policlonal do coelho com o objetivo de avaliar potenciais alvos de imunoterapia. Tendo sido reconhecidas outras proteínas no extrato proteico das células dos casos clínicos, que podem corresponder a recetores potenciais. Portanto, como próximo passo será interessante realizar a análise dos recetores mais identificados no biobanco e inferir se poderiam ser usados como alvos terapêuticos ou como biomarcador / diagnóstico.

Além disso, quando foi utilizado o reagente *Mem-PER<sup>TM</sup> Plus Membrane* para a lise das células CLBL-1 e extração da proteína das mesmas, a aplicação desta técnica permitiu aumentar a especificidade, dado que só se isola as proteínas membranares. Sendo assim, na continuação do estudo será interessante utilizar novamente este reagente na extração proteica das células primárias de linfoma canino, e observar o perfil proteico de cada uma das frações separadamente. Bem como, sequenciar e caraterizar de seguida os recetores membranares identificados através da técnica de Western Blot.

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo e a continuação da caraterização e validação da expressão de outros alvos, assim como a construção de bibliotecas de anticorpos que reconheçam estes recetores no cão e que promovam a depleção imunoterapêutica de linfócitos B, poderão contribuir posteriormente para o desenvolvimento da imunoterapia no linfoma B canino.

## Bibliografia

- Aires, F., Li, M., Rato, S., Maia, S., Malhó, R., Warren, K., Harrich, D., Craigie, R., Barbas, C. & Gonçalves, J. (2014). Recombinant rabbit single-chain antibodies bind to the catalytic and C-terminal domains of HIV-1 integrase protein and strongly inhibit HIV-1 replication. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(5), 353–366. Acedido em Nov. 15, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917493/>
- Alexandrakis, I., Tuli, R., Ractliffe, S.C., Tappin, S.W., Foale, R.D., Roos, A. & Slater, K.J. (2014). Utility of a multiple serum biomarker test to monitor remission status and relapse in dogs with lymphoma undergoing treatment with chemotherapy. *Veterinary and Comparative Oncology*, 15(1), 6-17. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12123/abstract>
- Al-Katib, A.M., Aboukameel, A., Mohammad, R., Bissery, M.C. & Zuany-Amorim, C. (2009). Superior antitumor activity of SAR3419 to rituximab in xenograft models for non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(12), 4038–4045. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/12/4038.long>
- Assin, R., Baldi, A., Citro, G. & Spugnini, E.P. (2008). Prostate as sole unusual recurrence site of lymphoma in a dog. *In Vivo*, 22(6), 755-757. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://iv.iijournals.org/content/22/6/755.long>
- Atherton, M.J., Braceland, M., Fontaine, S., Waterston, M.M., Burchmore, R.J., Eadie, S., Eckersall, P.D. & Morris, J.S. (2013). Changes in the serum proteome of canine lymphoma identified by electrophoresis and mass spectrometry. *The Veterinary Journal*, 196(3), 320-324. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312005370>
- Aubry, O.A., Spangler, E.A., Schleis, S.E. & Smith, A.N. (2014). Evaluation of bone marrow aspirates from multiple sites for staging of canine lymphoma and mast cell tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, 12(1), 58-66. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00331.x/abstract>
- Aupperle, H., Marz, I., Ellenberger, C., Buschatz, S., Reischauer, A. & Schoon, H.A. (2007). Primary and secondary heart tumours in dogs and cats. *Journal of Comparative Pathology*, 136(1), 18-26. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997506000880>
- Avery, A. (2009). Molecular diagnostics of hematologic malignancies. *Topics in Companion Animal Medicine*, 24(3), 144–150. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: [http://www.companimalmed.com/article/S1938-9736\(09\)00021-X/fulltext](http://www.companimalmed.com/article/S1938-9736(09)00021-X/fulltext)
- Awan, F.T., Lapalombella, R., Trotta, R., Butchar, J.P., Yu, B., Benson, D.M., Roda, J.M., Cheney, C., Mo, X., Lehman, A., Jones, J., Flynn, J., Jarjoura, D., Desjarlais, J.R., Tridandapani, S., Caligiuri, M.A., Muthusamy, N. & Byrd, J.C. (2010). CD19 targeting of chronic lymphocytic leukemia with a novel Fc-domain-engineered monoclonal antibody. *Blood*, 115(6), 1204–1213. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/115/6/1204.long?sso-checked=true>

- Ballegeer, E.A., Hollinger, C. & Kunst, C.M. (2013). Imaging diagnosis - multicentric lymphoma of granular lymphocytes imaged with FDG PET/CT in a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 54(1), 75-80. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2012.01988.x/abstract>
- Bannink, E.O., Sauerbrey, M.L., Mullins, M.N., Hauptman, J.G. & Obradovich, J.E. (2008). Actinomycin D as rescue therapy in dogs with relapsed or resistant lymphoma: 49 cases (1999-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(3), 446-451. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.233.3.446>
- Bauer, N.B., Zervos, D. & Moritz, A. (2007). Argyrophilic nucleolar organizing regions and Ki67 equally reflect proliferation in fine needle aspirates of normal, hyperplastic, inflamed, and neoplastic canine lymph nodes (n=101). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(5), 928-935. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03045.x/abstract>
- Bergman, P.J., Ogilvie, G.K. & Powers, B.E. (1996). Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(6), 354-359. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02080.x/abstract>
- Berlato, D., Schrempp, D., Van Den Steen, N. & Murphy, S. (2012). Radiotherapy in the management of localized mucocutaneous oral lymphoma in dogs: 14 cases. *Veterinary and Comparative Oncology*, 10(1), 16-23. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2011.00270.x/abstract>
- Blackwood, L., German, A.J., Stell, A.J. & O'Neill, T. (2004). Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy. *Journal of Small Animal Practice*, 45, 259–262. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00233.x/abstract>
- Blanc, V., Bousseau, A., Caron, A., Carrez, C., Lutz, R.J. & Lambert, J.M. (2011). SAR3419: An Anti-CD19-Maytansinoid Immunoconjugate for the Treatment of B-Cell Malignancies. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(20), 6448–6458. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/17/20/6448.long>
- Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L. & Tedder, T.F. (1992). The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *The Journal of Immunology*, 149(9), 2841–2850. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/149/9/2841.long>
- Breton, C.S., Nahimana, A., Aubry, D., Macoin, J., Moretti, P., Bertschinger, M., Hou, S., Duchosal, M.A. & Back, J. (2014). A novel anti-CD19 monoclonal antibody (GBR 401) with high killing activity against B cell malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 7, 33. Acedido em Nov. 15, 2017, disponível em: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8722-7-33>
- Brody, J., Kohrt, H., Marabelle, A. & Levy, R. (2011). Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. *Journal of Clinical Oncology*, 29(14), 1864-75. Acedido em Set. 27, 2017, disponível em:



[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2010.33.4623?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2010.33.4623?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

- Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A. & Tedder, T.F. (1993). Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B-lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 121(5), 1121–1132. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://jcb.rupress.org/content/121/5/1121.long>
- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F. & Avery, A.C. (2003). Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40(1), 32-41. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.40-1-32?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.40-1-32?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Burton, J.H., Garrett-Mayer, E. & Thamm, D.H. (2013). Evaluation of a 15-week CHOP protocol for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 306-315. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2012.00324.x/abstract>
- Byrd, J.C., Kitada, S., Flinn, I.W., Aron, J.L., Pearson, M., Lucas, D. & Reed, J.C. (2002). The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*, 99(3), 1038–1043. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/99/3/1038.long?sso-checked=true>
- Caniatti, M., Roccabianca, P., Scanziani, E., Paltrinieri, S. & Moore, P.F. (1996). Canine lymphoma: immunocytochemical analysis of fine-needle aspiration biopsy. *Veterinary Pathology*, 33(2), 204-212. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589603300210?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589603300210?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Cardarelli, P.M., Rao-Naik, C., Chen, S., Huang, H., Pham, A., Moldovan-Loomis, M.C., Pan, C., Preston, B., Passmore, D., Liu, J., Kuhne, M.R., Witte, A., Blanset, D. & King, D.J. (2010). A nonfucosylated human antibody to CD19 with potent B-cell depletive activity for therapy of B-cell malignancies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(2), 257–265. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00262-009-0746-z>
- Carter, R.F., Valli, V.E. & Lumsden, J.H. (1986). The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50(2), 154–164. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255183/>
- Carter, R.H. & Barrington, R.A. (2004). Signaling by the CD19/CD21 complex on B cells. *Current Directions in Autoimmunity*, 7, 4–32. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <https://www.karger.com/Article/Pdf/75685>
- Cartwright, R., Brincker, H., Carli, P.M., Clayden, D., Coebergh, J.W., Jack, A., McNally, R., Morgan, G., de Sanjose, S., Tumino, R. & Vornanen, M. (1999). The rise in incidence of lymphomas in Europe 1985-1992. *European Journal of Cancer*, 35(4), 627-633. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: [http://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(98\)00401-8/fulltext](http://www.ejancer.com/article/S0959-8049(98)00401-8/fulltext)

- Chilosi, M., Castelli, P., Martignoni, G., Pizzolo, G., Montresor, E., Facchetti, F., Truini, M., Mombello, A., Lestani, M. & Scarpa, A. (1992). Neoplastic epithelial cells in a subset of human thymomas express the B cell-associated CD20 antigen. *The American Journal of Surgical Pathology*, 16(10), 988–997. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384372>
- Chiou, S.H., Chow, K.C., Yang, C.H., Chiang, S.F. & Lin, C.H. (2005). Discovery of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA signal and EBV nuclear antigen leader protein DNA sequence in pet dogs. *Journal of General Virology*, 86(Pt 4), 899-905. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.80792-0#tab2>
- Chun, R., Garrett, L.D. & Vail, D.M. (2000). Evaluation of a high-dose chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(2), 120-124. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02224.x/abstract>
- Cooper, L.J., Al-Kadhimi, Z., DiGiusto, D., Kalos, M., Colcher, D., Raubitschek, A., Forman, S.J. & Jensen, M.C. (2004). Development and application of CD19-specific T cells for adoptive immunotherapy of B cell malignancies. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 33(1), 83–89. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979604000464?via%3Dihub>
- Crabtree, A.C., Spangler, E., Beard, D. & Smith, A. (2010). Diagnostic accuracy of gray-scale ultrasonography for the detection of hepatic and splenic lymphoma in dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 51(6), 661-664. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2010.01725.x/abstract>
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov A.O. & Glennie M.J. (2005). The Biology of CD20 and Its Potential as a Target for mAb Therapy. *Current Directions in Autoimmunity*, 8, 140-174. Acedido em Ago. 26, 2017, disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/82102>
- Culmsee, K., Simon, D., Mischke, R. & Nolte, I. (2001). Possibilities of flow cytometric analysis for immunophenotypic characterization of canine lymphoma. *Transboundary and Emerging Diseases*, 48(4), 199-206. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0442.2001.00351.x/abstract>
- Dank, G., Rassnick, K.M., Kristal, O., Rodriguez, C.O., Clifford, C.A., Ward, R., Mallett, C.L., Gieger, T. & Segev, G. (2011). Clinical characteristics, treatment, and outcome of dogs with presumed primary hepatic lymphoma: 18 cases (1992-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(7), 966-971. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.239.7.966?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.239.7.966?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Day, M.J. (1995). Immunophenotypic characterization of cutaneous lymphoid neoplasia in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 112(1), 79-96. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199750580091X>
- Day, M.J. (1996). Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Journal of Small Animal Practice*, 37(11), 523-534. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1996.tb02313.x/abstract;jsessionid=A8E5DA48FEAA6F1766017E51993C67FF.f04t01>

Day, M.J. (1997). Review of thymic pathology in 30 cats and 36 dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 38, 393-403. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1997.tb03492.x/abstract>

Dervisis, N.G., Dominguez, P.A., Sarbu, L., Newman, R.G., Cadile, C.D., Swanson, C.N. & Kitchell, B.E. (2007). Efficacy of temozolomide or dacarbazine in combination with an anthracycline for rescue chemotherapy in dogs with lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(4), 563–569. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.231.4.563>

Dhaliwal, R.S., Reed, A.L. & Kitchell, B.E. (2001). Multicentric lymphosarcoma in a dog with multiple-site skeletal involvement. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42(1), 38-41. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2001.tb00901.x/abstract;jsessionid=853EA6B006567B4D6ED8E2BC998E2287.f02t01>

Di Bella, A., Maurella, C., Cauvin, A., Schmidt, J.M., Tapia, B.B. & North, S.M. (2013). Proteinuria in canine patients with lymphoma. *Journal of Small Animal Practice*, 54(1), 28-32. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12004.x/abstract>

Dimitrov, D. & Marks, J. (2009). Therapeutic Antibodies: Current state and future trends - Is a paradigm change coming soon? *Methods in Molecular Biology*, 525, 1-27. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: [https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-59745-554-1\\_1](https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-59745-554-1_1)

Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K. & Wood, J.L. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43(6), 240-246. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x/abstract>

Durno, A.S., Webb, J.A., Gauthier, M.J. & Bienzle, D. (2011). Polycythemia and inappropriate erythropoietin concentrations in two dogs with renal T-cell lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(2), 122-128. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: [http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-5614?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site](http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-5614?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site)

Edwards, D.S., Henley, W.E., Harding, E.F., Dobson, J.M. & Wood, J.L.N. (2003). Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*, 1(4), 200-206. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5810.2003.00025.x/abstract;jsessionid=FC4D6CA953D37435F167A3953231AE41.f04t03>

Elvers, I., Turner-Maier, J., Swofford, R., Koltookian, M., Johnson, J., Stewart, C., Zhang, C.Z., Schumacher, S.E., Beroukhim, R., Rosenberg, M., Thomas, R., Mauceli, E., Getz, G., Palma, F.D., Modiano, J.F., Breen, M., Lindblad-Toh, K. & Alföldi, J. (2015). Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns

- reflecting genetic background. *Genome Research*, 25(11), 1634-1645. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://genome.cshlp.org/content/25/11/1634.long>
- Ettinger, S.N. (2003). Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18(2), 92-97. Acedido em Set. 27, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096286703800075>
- Evans, J., Levesque, D. & Shelton, G.D. (2004). Canine inflammatory myopathies: a clinicopathologic review of 200 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(5), 679-691. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02606.x/abstract>
- Farinha, P. & Gascoyne, R.D. (2005). Helicobacter pylori and MALT lymphoma. *Gastroenterology*, 128(6), 1579–1605. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085%2805%2900607-4/abstract>
- Farkona, S., Diamandis, E. P. & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, 14, 73. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4858828/>
- Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., Gaulard, P., Salles, G., Bosly, A., Gisselbrecht, C., Reyes, F. & Coiffier, B. (2005). Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology*, 23(18), 4117-4126. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <http://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2005.09.131>
- Flood-Knapik, K.E., Durham, A.C., Gregor, T.P., Sanchez, M.D., Durney, M.E. & Sorenmo, K.U. (2013). Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 11(4), 272-286. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2011.00317.x/abstract>
- Flory, A.B., Rassnick, K.M., Stokol, T., Scrivani, P.V. & Erb, H.N. (2007). Stage migration in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(5), 1041-1047. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03062.x/abstract>
- Forero-Torres, A., Moskowitz, C., Advani, R., Shah, B.D., Kostic, A., Albertson, T. M., Sandalic, L., Zhao, B. & Fanale, M. A. (2014). Interim analysis of a phase 1, open-label, dose-escalation study of SGN-CD19A in patients with relapsed or refractory B-lineage non-Hodgkin lymphoma (NHL). ASCO Annual Meeting Proceedings. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15), 8505. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: [http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.8505](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.8505)
- Foster, A.P., Sturgess, C.P., Gould, D.J., Iwasaki, T. & Day, M.J. (2000). Pemphigus foliaceus in association with systemic lupus erythematosus and subsequent lymphoma in a cocker spaniel. *Journal of Small Animal Practice*, 41(6), 266–270. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03938.x/abstract>

- Frantz, A.M., Sarver, A.L., Ito, D., Phang, T.L., Karimpour-Fard, A., Scott, M.C., Valli, V.E., Lindblad-Toh, K., Burgess, K.E., Husbands, B.D., Henson, M.S., Borgatti, A., Kisseberth, W. C., Hunter, L. E., Breen, M., O'Brien, T.D. & Modiano, J.F. (2013). Molecular profiling reveals prognostically significant subtypes of canine lymphoma. *Veterinary Pathology*, 50(4), 693-703. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985812465325>
- Fujimoto, M., Poe, J.C., Inaoki, M. & Tedder, T.F. (1998). CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Seminars in Immunology*, 10(4), 267–277. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532398999997?via%3Dihub>
- Gaines, P.J., Powell, T.D., Walmsley, S.J., Estredge, K.L., Wisniewski, N., Stinchcomb, D.T., Withrow, S.J. & Lana, S.E. (2007). Identification of serum biomarkers for canine B-cell lymphoma by use of surface-enhanced laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *American Journal of Veterinary Research*, 68(4), 405-410. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.68.4.405>
- Garrett, L.D., Thamm, D.H., Chun, R., Dudley, R. & Vail, D.M. (2002). Evaluation of a 6-month chemotherapy protocol with no maintenance therapy for dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(6), 704–709. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02411.x/abstract>
- Garrido, F., Algarra, I. & Garcia-Lora, A.M. (2010). The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(10), 1601–1606. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00262-010-0893-2>
- Gavazza, A., Presciuttini, S., Barale, R., Lubas, G. & Gugliucci, B. (2001). Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(3), 190-195. Acedido em Set. 22, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2001.tb02310.x/abstract>
- Gavazza, A., Lubas, G., Valori, E. & Gugliucci, B. (2008). Retrospective survey of malignant lymphoma cases in the dog: clinical, therapeutical and prognostic features. *Veterinary Research Communications*, 32, S291-93. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11259-008-9131-1>
- Gelain, M.E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L. & Comazzi, S. (2008). Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(3-4), 179-188. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242707003480?via%3Dihub>
- Giraudel, J.M., Pages, J.P. & Guelfi, J.F. (2002). Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(2), 135-147. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://jaaha.org/doi/10.5326/0380135?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site](http://jaaha.org/doi/10.5326/0380135?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&rfr_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site)

- Greenlee, P.G., Filippa, D.A., Quimby, F.W., Patnaik, A.K., Calvano, S.E., Matus, R.E., Kimmell, M., Hurvitz, A.I. & Lieberman, P.H. (1990). Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, 66(3), 480-490. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19900801\)66:3%3C480::AID-CNCR2820660314%3E3.0.CO;2-X/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19900801)66:3%3C480::AID-CNCR2820660314%3E3.0.CO;2-X/abstract)
- Griessmayr, P.B., Payne, S.E., Winter, J.E., Barber, L.G. & Shofer, F.S. (2009). Dacarbazine as single-agent therapy for relapsed lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1227–1231. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0376.x/abstract>
- Grillo-López, A.J. (2002). Monoclonal antibody therapy for B-cell lymphoma. *International Journal of Hematology*, 76(5), 385–393. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02982803>
- Grindem, C.B., Breitschwadt, E.B., Corbett, W.T., Page, R.L. & Jans, H.E. (1994). Thrombocytopenia associated with neoplasia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(6), 400–405. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1994.tb03258.x/abstract>
- Grossbard, M.L., Multani, P.S., Freedman, A.S., O'Day, S., Gribben, J.G., Rhuda, C., Neuberg, D. & Nadler, L.M. (1999). A Phase II study of adjuvant therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5(9), 2392–2398. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/5/9/2392.long>
- Gustafson, N.R., Lana, S.E., Mayer, M.N. & LaRue, S.M. (2004). A preliminary assessment of whole-body radiotherapy interposed within a chemotherapy protocol for canine lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, 2(3), 125-131. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5810.2004.00046.x/abstract>
- Guth, A.M. & Dow, S. (2013). Cancer Immunotherapy. In S.J. Withrow, D.M. Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th Ed.). (pp. 198-208). Missouri: Elsevier Saunders.
- Haas, K.M. & Tedder, T.F. (2005). Role of the CD19 and CD21/35 Receptor Complex in Innate Immunity, Host Defense and Autoimmunity. In S. Gupta, W.E. Paul & R. Steinman (Eds.), *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation X: Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Vol. 560). Boston: Springer US.
- Hahn, K.A., Richardson, R.C., Hahn, E.A. & Chrisman, C.L. (1994). Diagnostic and prognostic importance of chromosomal aberrations identified in 61 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Pathology*, 31(5), 528–540. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589403100504?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589403100504?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Harris, N.L., Jaffe, E.S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H.K., Vardiman, J., Lister, T.A. & Bloomfield, C.D. (1999). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Annals of*

*Oncology*, 10(12), 1419-1432. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643532>

Hart, B.L., Hart, L.A., Thigpen, A.P. & Willits, N.H. (2014). Long-term health effects of neutering dogs: comparison of Labrador retrievers with golden retrievers. *PLoS One*, 9(7). Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102241>

Hekman, A., Honselaar, A., Vuist, W.M., Sein, J.J., Rodenhuis, S., ten Bokkel Huinink, W.W., Somers, R., Rumke, P. & Melief, C.J. (1991). Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 32(6), 364–372. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706642>

Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P. & Tomlinson, I. M. (2003). Domain antibodies: Proteins for therapy. *Trends in Biotechnology*, 21(11), 484–490. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: [http://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(03\)00245-2?\\_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779903002452%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(03)00245-2?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779903002452%3Fshowall%3Dtrue)

Huang, S.H., Kozak, P.J., Kim, J., Habineza-Ndikuyeze, G., Meade, C., Gaurner-Hausser, A., Patel, R., Robertson, E. & Mason, N.J. (2012). Evidence of an oncogenic gammaherpesvirus in domestic dogs. *Virology*, 427(2), 107-117. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4592777/>

Hultin, L.E., Hausner, M.A., Hultin, P.M. & Giorgi, J.V. (1993). CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes. *Cytometry Part A*, 14(2), 196–204. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.990140212/abstract>

Impellizeri, J.A., Howell, K., McKeever, K.P. & Crow, SE. (2006). The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *The Veterinary Journal*, 171(3), 556–558. Acedido em Set. 27, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023305000717?via%3Dihub>

Ito, D., Brewer, S., Modiano, J.F. & Beall, M.J. (2015). Development of a novel anti-canine CD20 monoclonal antibody with diagnostic and therapeutic potential. *Leukemia & Lymphoma*, 56(1), 219-225. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.914193?journalCode=ilal20>

Ito, T., Hisasue, M., Neo, S., Ishikawa, T., Shida, T., Watanabe, T., Enomoto, Y., Okuda, M., Tsuchiya, R., Madarame, H., Ogata, M. & Yamada, T. (2007). A case of atypical canine lymphoma with oral mass and multiple osteolysis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(9), 977-980. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/9/69\\_9\\_977/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/69/9/69_9_977/_article)

Jagielski, D., Lechowski, R., Hoffmann-Jagielska, M. & Winiarczyk, S. (2002). A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 49(8), 419-424. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0442.2002.00458.x/abstract>

- Jain, S., Aresu, L., Comazzi, S., Shi, J., Worrall, E., Clayton, J., Humphries, W., Hemmington, S., Davis, P., Murray, E., Limeneh, A.A., Ball, K., Ruckova, E., Muller, P., Vojtesek, B., Fahraeus, R., Argyle, D. & Hupp, T.R. (2016). The Development of a Recombinant scFv Monoclonal Antibody Targeting Canine CD20 for Use in Comparative Medicine. *PLoS One*, 11(2). Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0148366>
- Joetzke, A.E., Eberle, N., Nolte, I., Mischke, R. & Simon, D. (2012). Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites dein dogs with multicentric lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73(6), 884-893. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.73.6.884>
- Jubala, C.M., Wojcieszyn, J.W., Valli, V.E., Getzy, D.M., Fosmire, S.P., Coffey, D., Bellgrau, D. & Modiano, J.F. (2005). CD20 expression in normal canine B cells and in canine non-Hodgkin lymphoma. *Veterinary Pathology*, 42(4), 468-476. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.42-4-468?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.42-4-468?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Kaldrymidou, E., Papaioannou, N., Poutahidis, T., Karayannopoulou, M., Gruys, E., Toliou, T. & Tsangaris, T. (2000). Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 47(8), 457-462. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0442.2000.00293.x/abstract>
- Kano, R., Inoie, C., Okano, H., Yamazaki, J., Takahashi, T., Watari, T., Tokuriki, M. & Hasegawa, A. (2005). Canine CD20 gene. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 108(3-4), 265-268. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705001704?via%3Dihub>
- Kazkaz, H. & Isenberg, D. (2004). Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(4), 398-402. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489204000864?via%3Dihub>
- Keller, E.T. (1992). Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer*, 70(9), 2334-2337. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19921101\)70:9%3C2334::AID-CNCR2820700920%3E3.0.CO;2-7/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19921101)70:9%3C2334::AID-CNCR2820700920%3E3.0.CO;2-7/abstract)
- Keller, E.T., MacEwen, E.G., Rosenthal, R.C., Helfand, S.C. & Fox, L.E. (1993). Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7(5), 289-295. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1993.tb01021.x/abstract>
- Kessler, M., Kandel-Tschiederer, B., Pfleghaar, S. & Tassani-Prell, M. (2008). Primary malignant lymphoma of the urinary bladder in a dog: long term remission following treatment with radiation and chemotherapy. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 150(11), 565-569. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <https://sat.gstsvs.ch/de/sat/sat-artikel/archiv/2008/112008/primary-malignant-lymphoma-of-the-urinary-bladder-in-a-dog-longterm-remission-following-treatment-w.html>



- Khanna, C., London, C. & Vail, D. (2009). Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 15(18), 5671–5677. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/18/5671>
- Kinns, J. & Mai, W. (2007). Association between malignancy and sonographic heterogeneity in canine and feline abdominal lymph nodes. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48(6), 565–569. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2007.00298.x/abstract>
- Kiupel, M., Teske, E. & Bostock, D. (1999). Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36(4), 292-300. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.36-4-292?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.36-4-292?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Kluin, P. & Schuurin, E. (2011). Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010? *Histopathology*, 58(1), 128-144. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2010.03700.x/abstract;jsessionid=15A54122032876684BEF42D7179ACF04.f04t02>
- Ko, J.S., Kim, H.J., Han, S. & Do, S.H. (2013). Primary lymphoma of the uterine horn in a Lhasa Apso dog. *Irish Veterinary Journal*, 66(1), 24. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-0481-66-24>
- Labelle, P. & De Cock, H.E. (2005). Metastatic tumors to the adrenal glands in domestic animals. *Veterinary Pathology*, 42(1), 52-58. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.42-1-52?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.42-1-52?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Lage, H. (2008). An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), 3145-3167. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-008-8111-5>
- Lahmers, S.M., Mealey, K.L., Martinez, S.A., Halderson, G.J., Sellon, R.K. & Cambridge, A.J. (2002). Synovial T-cell lymphoma of the stifle in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38(2), 165-168. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: [http://jaaha.org/doi/10.5326/0380165?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site](http://jaaha.org/doi/10.5326/0380165?url_ver=Z39.88-2003&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed&rfr_id=ori:rid:crossref.org&code=amah-site)
- Laing, E.J., Fitzpatrick, P.J., Binnington, A.G., Norris, A.M., Mosseri, A., Rider, W.D., Valli, V.E. & Baur, A. (1989). Half-body radiotherapy in the treatment of canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3(2), 102-108. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1989.tb03087.x/abstract>
- Lamagna, B., Lamagna, F., Meomartino, L., Paciello, O. & Fatone, G. (2006). Polyostotic lymphoma with vertebral involvement and spinal extradural compression in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(1), 71-76. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://jaaha.org/doi/abs/10.5326/0420071>
- Lana, S.E., Jackson, T.L., Burnett, R.C., Morley, P.S. & Avery, A.C. (2006). Utility of polymerase chain reaction for analysis of antigen receptor rearrangement in staging and predicting prognosis in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), 329-

334. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2006.tb02864.x/abstract>
- Lawrence, J., Vanderhoek, M., Barbee, D., Jeraj, R., Tumas, D.B. & Vail, D.M. (2009). Use of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-hodgkin's lymphoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 50(6), 660-668. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2009.01612.x/abstract>
- LeBlanc, A.K., Jakoby, B.W., Townsend, D.W. & Daniel, G.B. (2009). 18FDG-PET imaging in canine lymphoma and cutaneous mast cell tumor. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 50(2), 215-223. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2009.01520.x/abstract>
- Lee, J.J., Hughes, C.S., Fine, R.L. & Page, R.L. (1996). P-glycoprotein expression in canine lymphoma: a relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*, 77(9), 1892-1898. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960501\)77:9%3C1892::AID-CNCR20%3E3.0.CO;2-U/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0142(19960501)77:9%3C1892::AID-CNCR20%3E3.0.CO;2-U/abstract)
- Li, J. & Zhu, Z. (2010). Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1198-1207. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps2010120>
- Lin, W.W. & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1175-1183. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857251/>
- Lucroy, M.D., Phillips, B.S., Kraegel, S.A., Simonson, E.R. & Madewell, B.R. (1998). Evaluation of single-agent mitoxantrone as chemotherapy for relapsing canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12(5), 325-329. Acedido em Set. 22, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1998.tb02130.x/full>
- Lurie, D.M., Gordon, I.K., Theon, A.P., Rodriguez, C.O., Suter, S.E., & Kent, M.S. (2009). Sequential low-dose rate half-body irradiation and chemotherapy for the treatment of canine multicentric lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5), 1064-1070. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0353.x/abstract>
- MacEwen, E.G., Hayes, A.A., Matus, R.E. & Kurzman I. (1987). Evaluation of some prognostic factors for advanced multicentric lymphosarcoma in the dog: 147 cases (1978-1981). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(5), 564-568. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/19604022\\_Evaluation\\_of\\_some\\_prognostic\\_factors\\_for\\_advanced\\_multicentric\\_lymphosarcoma\\_in\\_the\\_dog\\_147\\_cases\\_1978-1981](https://www.researchgate.net/publication/19604022_Evaluation_of_some_prognostic_factors_for_advanced_multicentric_lymphosarcoma_in_the_dog_147_cases_1978-1981)
- MacGregor, J.M., Faria, M.L., Moore, A.S., Tobias, A.H., Brown, D.J. & de Moraes, H.S. (2005). Cardiac lymphoma and pericardial effusion in dogs: 12 cases (1994-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(9), 1449-1453. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.2005.227.1449>
- Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F. & Zini, E. (2009). Association between waste management and cancer in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 564-569. Acedido em

Set. 1, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0278.x/full>

Marconato, L., Stefanello, D., Valenti, P., Bonfanti, U., Comazzi, S., Roccabianca, P., Caniatti, M., Romanelli, G., Massari, F. & Zini, E. (2011). Predictors of long-term survival in dogs with high-grade multicentric lymphoma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(4), 480-485. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.238.4.480?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.238.4.480?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Martini, V., Melzi, E., Comazzi, S. & Gelain, M.E. (2013). Peripheral blood abnormalities and bone marrow infiltration in canine large B-cell lymphoma: is there a link? *Veterinary and Comparative Oncology*, 13(2), 117-23. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12024/abstract>

Massa, K.L., Gilger, B.C., Miller, T.L. & Davidson, M.G. (2002). Causes of uveitis in dogs: 102 cases (1989-2000). *Veterinary Ophthalmology*, 5(2), 93-98. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1463-5224.2002.00217.x/abstract>

McCaw, D.L., Chan, A.S., Stegner, A.L., Mooney, B., Bryan, J.N., Turnquist, S.E., Henry, C.J., Alexander, H. & Alexander, S. (2007). Proteomics of canine lymphoma identifies potential cancer-specific protein markers. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2496-2503. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/13/8/2496.long>

Mealey, K.L., Fidel, J., Gay, J.M., Impellizeri, J.A., Clifford, C.A., & Bergman, P.J. (2008). ABCB1-1  $\Delta$  polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 996-1000. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0122.x/abstract>

Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, M., Cardellino, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G. & Bocchini, V. (2008). Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 976-984. Acedido em Set. 18, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x/abstract>

Messinger, J.S., Windham, W.R. & Ward, C.R. (2009). Ionized hypercalcemia in dogs: a retrospective study of 109 cases (1998-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), 514-519. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0288.x/pdf>

Milman, G., Smith, K.C. & Erles, K. (2011). Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 150(1-2), 15-20. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510005869?via%3Dihub>

Milner, R.J., Pearson, J., Nesbit, J.W. & Close, P. (1996). Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-mixed paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 63(4), 309-313. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9173362>

- Modiano, J.F., Breen, M., Burnett, R.C., Parker, H.G., Inusah, S., Thomas, R., Avery, P.R., Lindblad-Toh, K., Ostrander, E.A., Cutterand, G.C. & Avery, A. C. (2005). Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Research*, 65(13), 5654–5661. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/13/5654.long>
- Mohrmann, R.L. & Arber, D.A. (2000). CD20-positive peripheral T-cell lymphoma: report of a case after nodular sclerosis Hodgkin's disease and review of the literature. *Modern Pathology*, 13(11), 1244–1252. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v13/n11/full/3880229a.html?foxtrotcallback=true>
- Moore, A.S., London, C.A., Wood, C.A., Williams, L.E., Cotter, S.M., L'Heureux, D.A. & Frimberger, A.E. (1999). Lomustine (CCNU) for the treatment of resistant lymphoma in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13(5), 395-398. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1999.tb01452.x/abstract>
- Moore, A.S., Ogilvie, G.K. & Vail, D.M. (1994). Actinomycin D for reinduction of remission in dogs with resistant lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 8(5), 343–344. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1994.tb03247.x/abstract>
- Morris, J. & Dobson, J. (2001). Haematopoietic System. In J. Morris, J. Dobson, *Small Animal Oncology*. (pp. 228 – 239). Oxford: Blackwell Science.
- Mudaliar, M.A., Haggart, R.D., Miele, G., Sellar, G., Tan, K.A., Goodlad, J.R., Milne, E., Vail, D.M., Kurzman, I., Crowther, D. & Argyle, D.J. (2013). Comparative gene expression profiling identifies common molecular signatures of NF-κB activation in canine and human diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *PLoS One*, 8(9). Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072591>
- Nasir, L. & Argyle, D.J. (1999). Mutational analysis of the tumour suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs. *Veterinary Record*, 145(1), 23–24. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/145/1/23.info>
- Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 293, 287–302. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-27702-1\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-27702-1_13)
- Nyman, H.T., Kristensen, A.T., Skovgaard, I.M. & McEvoy, F.J. (2005). Characterization of normal and abnormal canine superficial lymph nodes using gray-scale B-mode, color flow mapping, power, and spectral Doppler ultrasonography: a multivariate study. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 46(5), 404-410. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2005.00074.x/abstract>
- Nyman, H.T., Lee, M.H., McEvoy, F.J., Nielsen, O.L., Martinussen, T. & Kristensen, A.T. (2006). Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant superficial lymph nodes in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 67(6), 978-984. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em:

[http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.67.6.978?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.67.6.978?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

- O'Brien, D., Moore, P.F., Vernau, W., Peauoi, J.R., Rebhun, R.B., Rodriguez, C.O.Jr. & Skorupski, K.A. (2013). Clinical characteristics and outcome in dogs with splenic marginal zone lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(4), 949-954. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5012422/>
- Ogilvie, G., Proulx, D., Van Horn, L., Archer, G., Monreal, B., Moe, E., Pope, L., Hansen, G., Alkuzweny, B. & FitzPatrick, W. (2015). Treatment of canine B-cell lymphoma with chemotherapy and a canine anti-CD20 monoclonal antibody: a prospective double-blind, randomized, placebo-controlled study, in ACVIM Forum Research Reports Program. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(4), 1257–1283. Acedido em Nov. 21, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.13002/full>
- Oleinika, K., Nibbs, R.J., Graham, G.J. & Fraser, A.R. (2013). Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. *Clinical & Experimental Immunology*, 171(1), 36-45. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3530093/>
- Owen, L.N. (Ed.). (1980). *TNM classification of tumours in domestic animals*. Geneva: World Health Organization. . Acedido em Set. 11, 2017, from WHO IRIS – Institutional Repository for Information Sharing website: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68618>
- Paoloni, M. & Khanna, C. (2008). Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer*, 8(2), 147-156. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://www.nature.com/nrc/journal/v8/n2/full/nrc2273.html?foxtrotcallback=true>
- Parker, H.G., Kim, L.V., Sutter, N.B., Carlson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A. & Kruglyak, L. (2004). Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science*, 304(5674), 1160–1164. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/304/5674/1160>
- Pastor, M., Chalvet-Monfray, K., Marchal, T., Keck, G., Magnol, J.P., Fournel-Fleury, C. & Ponce, F. (2009). Genetic and environmental risk indicators in canine non-hodgkin's lymphomas: breed associations and geographic distribution of 608 cases diagnosed throughout France over 1 year. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(2), 301-310. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2008.0255.x/full>
- Pelham, J.T., Irwin, P.J. & Kay, P.H. (2003). Genetic hypomethylation in neoplastic cells from dogs with malignant lymphoproliferative disorders. *Research in Veterinary Science*, 74(1), 101–104. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528802001790?via%3Dihub>
- Piek, C.J., Rutteman, G.R. & Teske, E. (1999). Evaluation of the results of a L-asparaginase-based continuous chemotherapy protocol versus a short doxorubicin-based induction chemotherapy protocol in dogs with malignant lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 21(2), 44-49. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.1999.9694990>
- Pinzon-Charry, A., Ho, C.S., Laherty, R., Maxwell, T., Walker, D., Gardiner, R.A., O'Connor, L., Pyke, C., Schmidt, C., Furnival, C. & López, J.A. (2005). A population of HLA-DR+

- immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia*, 7(12), 1112–1122. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1501170/>
- Plosker, G.L. & Figgitt, D.P. (2003). Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*, 63(8), 803–843. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165/00003495-200363080-00005>
- Ponce, F., Magnol, J.P., Ledieu, D., Marchal, T., Turinelli, V., Chalvet-Monfray, K. & Fournel-Fleury, C. (2004). Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal*, 167(2), 158-166. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023303001898?via%3Dihub>
- Ponce, F., Marchal, T., Magnol, J.P., Turinelli, V., Ledieu, D., Bonnefont, C., Pastor, M., Delignette, M.L. & Fournel-Fleury, C. (2010). A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology. *Veterinary Pathology*, 47(3), 414-433. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810363902?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810363902?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Portell, C.A., Wenzell, C.M. & Advani, A.S. (2013). Clinical and pharmacologic aspects of blinatumomab in the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Pharmacology*, 5(Supplement 1), 5–11. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <https://www.dovepress.com/clinical-and-pharmacologic-aspects-of-blinatumomab-in-the-treatment-of-peer-reviewed-article-CPAA>
- Price, G.S., Page, R.L., Fischer, B.M., Levine, J.F. & Gerig, T.M. (1991). Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5(5), 259-262. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1991.tb03131.x/abstract>
- Rader, C., Ritter, G., Nathan, S., Elia, M., Gout, I., Jungbluth, A.A., Cohen, L.S., Welt, S., Old, L.J., Barbas, C.F. (2000). The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13668-13676. Acedido em Nov. 15, 2017, disponível em: <http://www.jbc.org/content/275/18/13668.long>
- Rao, S., Lana, S., Eickhoff, J., Marcus, E., Avery, P.R., Morley, P.S. & Avery, A.C. (2011). Class II major histocompatibility complex expression and cell size independently predict survival in canine B-cell lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1097–1105. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2011.0767.x/abstract>
- Rassidakis, G.Z., Medeiros, L.J., Viviani, S., Bonfante, V., Nadali, G.P., Vassilakopoulos, T.P., Mesina, O., Herling, M., Angelopoulou, M.K., Giardini, R., Chilosi, M., Kittas, C., McLaughlin, P., Rodriguez, M.A., Romaguera, J., Bonadonna, G., Gianni, A.M., Pizzolo, G., Pangalis, G.A., Cabanillas, F. & Sarris, A.H. (2002). CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 20(5), 1278–1287. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em:

[http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2002.20.5.1278?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2002.20.5.1278?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

- Rassnick, K.M., Mauldin, G.E., Al-Sarraf, R., Mauldin, G.N., Moore, A.S. & Mooney, S.C. (2002). MOPP chemotherapy for treatment of resistant lymphoma in dogs: a retrospective study of 117 cases (1989-2000). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(5), 576-580. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02390.x/abstract>
- Ratcliffe, L., Mian, S., Slater, K., King, H., Napolitano, M., Aucoin, D. & Mobasher, A. (2009). Proteomic identification and profiling of canine lymphoma patients. *Veterinary and Comparative Oncology*, 7(2), 92-105. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2008.00165.x/abstract>
- Raufi, A., Ebrahim, A.S. & Al-Katib, A. (2013). Targeting CD19 in B-cell lymphoma: emerging role of SAR3419. *Cancer Management and Research*, 5, 225-233. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <https://www.dovepress.com/targeting-cd19-in-b-cell-lymphoma-emerging-role-of-sar3419-peer-reviewed-article-CMAR>
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N. & Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83(2), 435-445. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/83/2/435.long?sso-checked=true>
- Reif, J.S., Lower, K.S. & Ogilvie, G.K. (1995). Residential exposure to magnetic fields and risk of canine lymphoma. *American Journal of Epidemiology*, 141(4), 352-359. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article-abstract/141/4/352/212535/Residential-Exposure-to-Magnetic-Fields-and-Risk?redirectedFrom=PDF>
- Reinis, M. (2010). Immunotherapy of MHC class I-deficient tumors. *Future Oncology*, 6(10), 1577-1589. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: [https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.10.128?rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fon.10.128?rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Rettig, W.J. & Old, L.J. (1989). Immunogenetics of human cell surface differentiation. *Annual Review of Immunology*, 7, 481-511. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.07.040189.002405>
- Richards, K.L. & Suter, S.E. (2015). Man's best friend: what can pet dogs teach us about non-Hodgkin's lymphoma? *Immunological Reviews*, 263(1), 173-191. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4269254/>
- Richards, K.L., Motsinger-Reif, A.A., Chen, H.W., Fedoriw, Y., Fan, C., Nielsen, D.M., Small, G.W., Thomas, R., Smith, C., Dave, S.S., Perou, C.M., Breen, M., Borst, L.B. & Suter, S.E. (2013). Gene profiling of canine B-cell lymphoma reveals germinal center and postgerminal center subtypes with different survival times, modeling human DLBCL. *Cancer Research*, 73(16), 5029-5039. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/16/5029.long>
- Rossi, G., Rossi, M., Vitali, C.G., Fortuna, D., Burrioni, D., Pancotto, L., Capecchi, S., Sozzi, S., Renzoni, G., Braca, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Ghiara, P. & Taccini, E. (1999). A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*.

- Infection and Immunity*, 67(6), 3112-3120. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://iai.asm.org/content/67/6/3112.full>
- Rue, S.M., Eckelman, B.P., Efe, J.A., Bloink, K., Deveraux, Q.L., Lowery, D. & Nasoff, M. (2015). Identification of a candidate therapeutic antibody for treatment of canine B-cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(3-4), 148-159. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242715000367?via%3Dihub>
- Ruslander, D.A., Gebhard, D.H., Tompkins, M.B., Grindem, C.B. & Page, R.L. (1997). Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. *In Vivo*, 11(2), 169-172. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179611>
- Saba, C.F., Hafeman, S.D., Vail, D.M. & Thamm, D.H. (2009). Combination chemotherapy with continuous L-asparaginase, lomustine and prednisone for relapsed canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(5), 1058-1063. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2009.0357.x/abstract>
- Saba, C.F., Thamm, D.H. & Vail, D.M. (2007). Combination chemotherapy with L-asparaginase, lomustine, and prednisone for relapsed or refractory canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(1), 127-132. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.tb02938.x/abstract>
- Sato, S., Ono, N., Steeber, D.A., Pisetsky, D.S. & Tedder, T.F. (1996). CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 157(10), 4371-4378. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/157/10/4371.long>
- Sato, S., Steeber, D.A., Jansen, P.J. & Tedder, T.F. (1997). CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *The Journal of Immunology*, 158(10), 4662-4669. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/158/10/4662>
- Schiffman, J.D. & Breen, M. (2015). Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 370(1673). Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/370/1673/20140231.long>
- Schreiber, T.H. & Podack, E.R. (2009). A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. *British Journal of Cancer*, 101(3), 381-386. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2720247/>
- Seelig, D.M., Perry, J.A., Zaks, K., Avery, A.C. & Avery, P.R. (2011). Monoclonal immunoglobulin protein production in two dogs with secretory B-cell lymphoma with mott cell differentiation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 239(11), 1477-1482. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.239.11.1477?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.239.11.1477?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Setoguchi, A., Sakai, T., Okuda, M., Minehata, K., Yazawa, M., Ishizaka, T., Watari, T., Nishimura, R., Sasaki, N., Hasegawa, A. & Tsujimoto, H. (2001). Aberrations of the p53



suppressor gene in various tumors in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 62(3), 433–439. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2001.62.433?journalCode=ajvr>

Shan, D., Ledbetter, J.A. & Press, O.W. (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 48(12), 673–683. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002620050016>

Shankel, C.A. (2005). Choanal lymphosarcoma in a 7-year-old golden retriever: diagnosis and treatment. *The Canadian Veterinary Journal*, 46(2), 166-169. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082866/>

Simon, D., Nolte, I., Eberle, N., Abbrederis, N., Killich, M. & Hirschberger, J. (2006). Treatment of dogs with lymphoma using a 12-week, maintenance-free combination chemotherapy protocol. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), 948-954. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2006.tb01810.x/abstract>

Sokolowska, J., Cywinska, A. & Malicka, E. (2005). p53 expression in canine lymphoma. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 52(4), 172–175. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0442.2005.00707.x/abstract>

Sozmen, M., Tasca, S., Carli, E., De Lorenzi, D., Furlanello, T. & Caldin, M. (2005). Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(4), 323-330. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870501700404?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870501700404?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Starrak, G.S., Berry, C.R., Page, R.L., Johnson, J.L. & Thrall, D.E. (1997). Correlation between thoracic radiographic changes and remission/survival duration in 270 dogs with lymphosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 38(6), 411-418. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.1997.tb00863.x/abstract>

Statham-Ringen, K.A., Selting, K.A., Lattimer, J.C., Henry, C.J., Green, J.A., Bryan, J.N., Jia, F. & Lewis, M.R. (2012). Evaluation of a B-cell leukemia-lymphoma 2-specific radiolabeled peptide nucleic acid-peptide conjugate for scintigraphic detection of neoplastic lymphocytes in dogs with B-cell lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73(5), 681-688. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.73.5.681?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.73.5.681?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Stefanello, D., Valenti, P., Zini, E., Comazzi, S., Gelain, M.E., Roccabianca, P., Avallone, G., Caniatti, M. & Marconato, L. (2011). Splenic marginal zone lymphoma in 5 dogs (2001-2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(1), 90-93. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2010.0639.x/abstract>

Stein R., Balkman, C., Chen, S., Rassnick, K., McEntee, M., Page, R. & Goldenberg, D.M. (2011). Evaluation of anti-human leukocyte antigen-DR monoclonal antibody therapy in

- spontaneous canine lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 52(2), 273–284. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2010.535182?journalCode=ilal20>
- Steinberg, H., Dubielzig, R.R., Thomson, J. & Dzata, G. (1995). Primary gastrointestinal lymphosarcoma with epitheliotropism in three shar-pei and one boxer dog. *Veterinary Pathology*, 32(4), 423-426. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589503200413?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098589503200413?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Stewart, T.J. & Smyth, M.J. (2011). Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(1), 125–140. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10555-011-9280-5>
- Sueiro, F.A., Alessi, A.C. & Vassallo, J. (2004). Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations on p53 immunoexpression. *Journal of Comparative Pathology*, 131(2-3), 207–213. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997504000489?via%3Dihub>
- Surman, D.R., Irvine, K.R., Shulman, E.P., Allweis, T.M., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (1998). Generation of polyclonal rabbit antisera to mouse melanoma associated antigens using gene gun immunization. *Journal of Immunological Methods*, 214(1-2), 51-62. Acedido em Nov. 15, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175998000362?via%3Dihub>
- Szili, D., Cserhalmi, M., Bankó, Z., Nagy, G., Szymkowski, D. E. & Sármay, G. (2014). Switching off B cells by Fc-engineered anti-CD19 antibody (XmAb5871). *Annals of the rheumatic diseases*, 73, A37. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: [http://ard.bmj.com/content/73/Suppl\\_1/A37.1](http://ard.bmj.com/content/73/Suppl_1/A37.1)
- Takashima-Uebelhoer, B.B., Barber, L.G., Zagarins, S.E., Procter-Gray, E., Gollenberg, A.L., Moore, A.S. & Bertone-Johnson, E.R. (2012). Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non- Hodgkin's lymphoma. *Environmental Research*, 112, 171-176. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3267855/>
- Takeuchi, Y., Fujino, Y., Goto-Koshino, Y., Ohno, K., Uchida, K., Nakayama, H. & Tsujimoto, H. (2010). Long term survival of primary skeletal muscle lymphoma in a miniature dachshund. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 673-677. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/5/72\\_09-0454/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/5/72_09-0454/_article)
- Tappin, S.W., Taylor, S.S., Tasker, S., Dodkin, S.J., Papasouliotis, K. & Murphy, K.F. (2011). Serum protein electrophoresis in 147 dogs. *Veterinary Record*, 168(17), 456. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/168/17/456.long>
- Tedder, T. F. & Isaacs, C. M. (1989). Isolation of cDNAs encoding the CD1Y antigen of human and mouse B lymphocytes: a new member of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of Immunology*, 143(2), 712-717. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/143/2/712.long>
- Tedder, T.F. (2009). CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 5(10), 572–577. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em:

<http://www.nature.com/nrrheum/journal/v5/n10/full/nrrheum.2009.184.html?foxtrotcallback=true>

- Tedder, T.F., Klejman, G., Disteché, C.M., Adler, D.A., Schlossman, S.F. & Saito, H. (1988a). Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to the human B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19. *The Journal of Immunology*, 141(12), 4388–4394. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/141/12/4388.long>
- Tedder, T.F., Klejman, G., Schlossman, S.F. & Saito, H. (1989). Structure of the gene encoding the human B-lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1). *The Journal of Immunology*, 142(7), 2560–2568. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/142/7/2560.long>
- Tedder, T.F., McIntyre, G. & Schlossman, S.F. (1988b). Heterogeneity in the B1 (CD20) cell surface molecule expressed by human B-lymphocytes. *Molecular Immunology*, 25(12), 1321–1330. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0161589088900478>
- Tedder, T.F., Streuli, M., Schlossman, S.F. & Saito, H. (1988c). Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell surface antigen of human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), 208–212. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.pnas.org/content/85/1/208.long>
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W., Hack, C.E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J.G. & Glennie, M.J. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 104(6), 1793–1800. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/104/6/1793.long?sso-checked=true>
- Teske, E. & van Heerde, P. (1996). Diagnostic value and reproducibility of fine-needle aspiration cytology in canine malignant lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 18(3), 112–115. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1996.9694630>
- Teske, E., de Vos, J.P., Egberink, H.F. & Vos, J.H. (1994a). Clustering in canine malignant lymphoma. *Veterinary Quarterly*, 16(2), 134–136. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.1994.9694435>
- Teske, E., van Heerde, P., Rutteman, G.R., Kurzman, I.D., Moore, P.F. & MacEwen, E.G. (1994b). Prognostic factors for treatment of malignant lymphoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 205(12), 1722–1728. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744644>
- Thalheim, L., Williams, L.E., Borst, L.B., Fogle, J.E. & Suter, S.E. (2013). Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1509–1516. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12185/abstract>

- Thamm, D.H., Grunerud, K.K., Rose, B.J., Vail, D.M. & Bailey, S.M. (2013). DNA repair deficiency as a susceptibility marker for spontaneous lymphoma in golden retriever dogs: a case-control study. *PLoS One*, 8(7). Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0069192>
- Thomas, R., Smith, K.C., Ostrander, E.A., Galibert, F. & Breen, M. (2003). Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British Journal of Cancer*, 89(8), 1530–1537. Acedido em Set. 6, 2017, disponível em: <https://www.nature.com/bjc/journal/v89/n8/full/6601275a.html>
- Tobinai, K. (2002). Monoclonal antibody therapy for B-cell lymphoma: clinical trials of an anti-CD20 monoclonal antibody for B-cell lymphoma in Japan. *International Journal of Hematology*, 76, 411–419. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02982806>
- Topp, M.S., Goekbuget, N., Zugmaier, G., Viardot, A., Stelljes, M., Neumann, S., Horst, H.A., Reichle, A., Marks, R.E., Brueggemann, M., Ritgen, M., Klappers, P., Mergen, N., Goebeler, M.E., Einsele, H., Hoelzer, D. & Bargou, R. (2011). Anti-CD19 BiTE Blinatumomab induces high complete remission rate in adult patients with relapsed b-precursor all: updated results of an ongoing Phase II Trial. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 118(21), 252. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/118/21/252?sso-checked=true>
- Torres de la Riva, G., Hart, B.L., Farver, T.B., Oberbauer, A.M., Messam, L.L., Willits, N., & Hart, L.A. (2013). Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLoS One*, 8(2). Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572183/>
- Traullé, C. & Coiffier, B.B. (2005). Evolving role of rituximab in the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Future Oncology*, 1(3), 297–306. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: [https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.1517/14796694.1.3.297?rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=fon](https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.1517/14796694.1.3.297?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=fon)
- Uchida, J., Lee, Y., Hasegawa, M., Liang, Y., Bradney, A., Oliver, J.A., Bowen, K., Steeber, D.A., Haas, K.M., Poe, J.C. & Tedder, T.F. (2004). Mouse CD20 expression and function. *International Immunology*, 16(1), 119–129. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <https://academic.oup.com/intimm/article-lookup/doi/10.1093/intimm/dxh009>
- Vail, D.M. & MacEwen, E.G. (2000). Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781-792. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-59259-739-0\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-59259-739-0_12)
- Vail, D.M. & Thamm, D.H. (2005). Hematopoietic Tumors. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman, *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. (6th Ed.). (pp. 732-747). Missouri: Elsevier Saunders.
- Vail, D.M., Michels, G.M., Khanna, C., Selting, K.A., London, C.A. & Veterinary Cooperative Oncology Group. (2010). Response evaluation criteria for peripheral nodal lymphoma in dogs (v1.0) - a Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG) consensus document.

*Veterinary and Comparative Oncology*, 8(1), 28-37. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2009.00200.x/abstract>

Vail, D.M., Pinkerton, M. E. & Young, K. M. (2013). Canine Lymphoma and Lymphoid Leukemias. In S.J. Withrow, D.M. Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th Ed.). (pp. 608-638). Missouri: Elsevier Saunders.

Vajdovich, P., Psáder, R., Tóth, Z.A. & Perge, E. (2004). Use of the argyrophilic nucleolar region method for cytologic and histologic examination of the lymph nodes in dogs. *Veterinary Pathology*, 41(4), 338-345. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.41-4-338?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.41-4-338?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Valli, V.E., Kass, P.H., San Myint, M. & Scott, F. (2013). Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. *Veterinary Pathology*, 50(5), 738-748. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985813478210?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985813478210?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Valli, V.E., San Myint, M., Barthel, A., Bienzle, D., Caswell, J., Colbatzky, F., Durham, A., Ehrhart, E.J., Johnson, Y., Jones, C., Kiupel, M., Labelle, P., Lester, S., Miller, M., Moore, P., Moroff, S., Roccabianca, P., Ramos-Vara, J., Ross, A., Scase, T., Tvedten, H. & Vernau, W. (2011). Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48(1), 198-211. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810379428?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0300985810379428?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Valli, V.E., Vernau, W., de Lorimier, L.P., Graham, P.S. & Moore, P.F. (2006). Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology*, 43(3), 241-256. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.43-3-241?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1354/vp.43-3-241?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Van Vetchten, M., Helfand, S.C. & Jeglum, K.A. (1990). Treatment of relapsed canine lymphoma with doxorubicin and dacarbazine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 4(4), 187-191. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.1990.tb00896.x/abstract>

van Zelm, M.C., Reisli, I., van der Burg, M., Castaño, D., van Noesel, C.J., van Tol, M.J., Woellner, C., Grimbacher, B., Patiño, P.J., van Dongen, J.J. & Franco, J.L. (2006). An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *The New England Journal of Medicine*, 354(18), 1901-1912. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa051568#t=article>

Vascellari, M., Tasca, S., Furlanello, T., Carli, E., Patron, C., Mutinelli, F. & Caldin, M. (2007). Vertebral polyostotic lymphoma in a young dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(2), 205-208. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870701900214?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/104063870701900214?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)

Veldhoen, N., Stewart, J., Brown, R. & Milner, J. (1998). Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*, 16(2), 249-255. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v16/n2/abs/1201489a.html?foxtrotcallback=true>

- Vezzali, E., Parodi, A.L., Marcato, P.S. & Bettini G. (2009). Histopathological classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. *Veterinary and Comparative Oncology*, 8(1), 38–49. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5829.2009.00201.x/abstract>
- Villamil, J.A., Henry, C.J., Hahn, A.W., Bryan, J.N., Tyler, J.W. & Caldwell, C.W. (2009). Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*, Article 591753. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2859020/>
- Vinay, D.S., Ryan, E.P., Pawelec, G., Talib, W.H., Stagg, J., Elkord, E., Lichter, T., Decker, W.K., Whelan, R.L., Kumara, H.M., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amin, A., Helferich, W.G., Boosani, C.S., Guha, G., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bilsland, A., Bhakta, D., Halicka, D., Fujii, H., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Nowsheen, S., Yang, X., Choi, B.K. & Kwon, B.S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, 185-198. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X1500019X?via%3Dihub>
- von Euler, H., Einarsson, R., Olsson, U., Lagerstedt, A.S. & Eriksson, S. (2004). Serum thymidine kinase activity in dogs with malignant lymphoma: a potent marker for prognosis and monitoring the disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(5), 696-702. Acedido em Jul. 8, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02608.x/abstract>
- von Schilling, C. (2003). Immunotherapy with anti-CD20 compounds. *Seminars in Cancer Biology*, 13(3), 211–222. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X0300018X>
- Wang, K., Wei, G. & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 1(1), 36. Acedido em Ago. 26, 2017, disponível em: <https://ehoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/2162-3619-1-36>
- Wilkerson, M.J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L. & Avery, A. (2005). Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106(3-4), 179–196. Acedido em Set. 11, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242705000681?via%3Dihub>
- Williams, L.E., Johnson, J.L., Hauck, M.L., Ruslander, D.M., Price, G.S. & Thrall, D.E. (2004). Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(5), 703-709. Acedido em Set. 5, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02609.x/abstract>
- Winter, M.D., Locke, J.E. & Penninck, D.G. (2006). Imaging diagnosis urinary obstruction secondary to prostatic lymphoma in a young dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 47(6), 597-601. Acedido em Set. 2, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1740-8261.2006.00193.x/abstract;jsessionid=8727D2B7637EA564A02BFC687B49D85E.f01t03>

- Yang, W., Agrawal, N., Patel, J., Edinger, A., Osei, E., Thut, D., Powers, J. & Meyerson, H. (2005). Diminished expression of CD19 in B-cell lymphomas. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*, 63(1), 28–35. Acedido em Ago. 31, 2017, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.20030/full>
- Ye, X.Z., Yu, S.C. & Bian, X.W. (2010). Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(7), 423–430. Acedido em Set. 26, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1673852709600618>
- Yohn, S.E., Hawkins, E.C., Morrison, W.B., Reams, R.Y., DeNicola, D.B. & Blevins, W.E. (1994). Confirmation of a pulmonary component of multicentric lymphosarcoma with bronchoalveolar lavage in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(1), 97-101. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8125829>
- Zalevsky, J., Leung, I.W., Karki, S., Chu, S.Y., Zhukovsky, E.A., Desjarlais, J.R., Carmichael, D.F. & Lawrence, C.E. (2009). The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcγ receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. *Blood*, 113(16), 3735–3743. Acedido em Nov. 14, 2017, disponível em: <http://www.bloodjournal.org/content/113/16/3735.long>
- Zandvliet, M. (2016). Canine lymphoma: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(2), 76-104. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/01652176.2016.1152633>
- Zandvliet, M., Rutteman, G.R. & Teske, E. (2013). Prednisolone inclusion in a first-line multidrug cytostatic protocol for the treatment of canine lymphoma does not affect therapy results. *The Veterinary Journal*, 197(3), 656-661. Acedido em Set. 4, 2017, disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023313001937?via%3Dihub>
- Zappasodi, R., de Braud, F. & Di Nicola, M. (2015). Lymphoma Immunotherapy: Current Status. *Frontiers in Immunology*, 6, 448. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555084/>
- Zhou, L.J., Ord, D.C., Omori, S.A. & Tedder, T.F. (1992). Structure of the genes encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. *Immunogenetics*, 35(2), 102–111. Acedido em Ago. 30, 2017, disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00189519>
- Zink, M.C., Farhooody, P., Elser, S.E., Ruffini, L.D., Gibbons, T.A. & Rieger, R.H. (2014). Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomized vizslas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(3), 309-319. Acedido em Set. 1, 2017, disponível em: [http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.244.3.309?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.244.3.309?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed)